

Aus der Anatomie  
der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Fokal segmentale Glomerulosklerose und  
juxtaglomerulärer Apparat der  
hypertensiven “fawn-hooded” Ratte**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Wilko Weichert  
aus Tübingen

Dekan: Prof. Dr. J. W. Dudenhausen

Gutachter:       1. Prof. Dr. S. Bachmann  
                      2. Prof. Dr. H. Pavenstädt  
                      3. Prof. Dr. H.-J. Gröne

Datum der Promotion: 17.12.2001

## Abstract (deutsch)

In dieser Arbeit wurden 8 und 16 Wochen alte, hypertensive „fawn-hooded“ Ratten (FHH8, FHH16) mit genetisch ähnlichen 16 Wochen alten „fawn-hooded“ Ratten mit nur geringgradiger Blutdruckerhöhung (FHL16, Kontrollgruppe) hinsichtlich der pathologisch-anatomischen Veränderungen der Nierenmorphologie und hinsichtlich der Expression von NO-Synthase-1 (NOS1), Cyclooxygenase-2 (COX-2) und Renin am juxtaglomerulären Apparat (JGA) verglichen. Die histopathologischen Veränderungen bei FHH16 umfassten die klassischen Schädigungszeichen der fokal segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) mit fokaler Überexpression von Kollagen IV und eine moderate Arteriopathie. Bei FHH8 ließen sich, wie bei FHL16 keine morphologischen Schädigungen nachweisen. Die NOS1-Aktivität an der Macula densa, untersucht mittels der NADPH-Diaphorasereaktion und die NOS1 mRNA Expression waren bei FHH8 (+153 and +88%;  $P < 0.05$ ) und FHH16 (+93 and +98%;  $P < 0.05$ ) im Vergleich zu FHL16 signifikant erhöht. Eine gleichgerichtete signifikante Erhöhung zeigte sich für die COX-2-Expression an der Macula densa von FHH8 (+166%;  $P < 0.05$ ) und FHH16 (+157%;  $P < 0.05$ ) im Vergleich zu FHL16. Des weiteren ließ sich eine signifikante, ebenfalls gleichgerichtete Überexpression von Renin in der afferenten Arteriole auf Protein- und mRNA-Ebene bei FHH8 (+51 and +166%;  $P < 0.05$ ) und FHH16 (+105 and +136%;  $P < 0.05$ ) im Vergleich zu FHL16 nachweisen. Somit konnte gezeigt werden, dass die gleichgerichtete Überexpression von NOS1, COX-2 und Renin am JGA bei der FHH-Ratte der Entwicklung einer fokal segmentalen Glomerulosklerose vorausgeht und damit möglicherweise pathogenetische Bedeutung für die Entstehung der Nierenschädigung bei diesem Rattenstamm hat.

**Schlagerworte:** Glomerulosklerose, NO, Prostaglandine, Renin

## Abstract (english)

This study describes elevated histochemical signals for nitric oxide synthase-1 (NOS1) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in juxtaglomerular apparatus (JGA) and adjacent thick ascending limb of the kidney of fawn-hooded hypertensive rats (FHH). Two different age groups of FHH (8 and 16 wk; FHH8 and FHH16, respectively) were compared with genetically related fawn-hooded rats with close to normal blood pressure (FHL) that served as controls. Histopathological changes in FHH16 comprised focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), focal matrix overexpression (mainly of collagen IV), and a moderate arteriopathy with hypertrophy of the media, enhanced immunoreactivity for alpha-smooth muscle actin, and altered distribution of myofibrils. Macula densa NOS activity, as expressed by NADPH-diaphorase staining, and NOS1 mRNA abundance were significantly elevated in FHH8 (+153 and +88%;  $P < 0.05$ ) and FHH16 (+93 and +98%;  $P < 0.05$ ), respectively. Even higher elevations were registered for COX-2 immunoreactivity in FHH8 (+166%;  $P < 0.05$ ) and FHH16 (+157%;  $P < 0.05$ ). The intensity of renin immunoreactivity and renin mRNA expression in afferent arterioles was also elevated in FHH8 (+51 and +166%;  $P < 0.05$ ) and FHH16 (+105 and +136%;  $P < 0.05$ ), respectively. Thus we show that coordinate upregulation of tubular NOS1, COX-2, and renin expression precedes, and continues after, the manifestation of glomerulosclerotic damage in FHH. These observations may have implications in understanding the role of local paracrine mediators in glomerular disease.

**Keywords:** glomerulosclerosis; nitric oxide; prostaglandins; renin

<b>IM TEXT VERWENDETE ABKÜRZUNGEN</b>	<b>6</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>8</b>
1.1 Allgemein	8
1.2 Die fokal segmentale Glomerulosklerose beim Menschen	8
1.2.1 Klassifikation und Häufigkeit	8
1.2.2 Morphologie	10
1.2.3 Pathogenese	10
1.2.4 Prognose und Therapie	11
1.3 Die „fawn-hooded“ Ratte	11
1.3.1 Herkunft	11
1.3.2 Systemischer Hypertonus	12
1.3.3 Pulmonaler Hypertonus	13
1.3.4 Proteinexkretion im Urin	13
1.3.5 Plättchendysfunktion	13
1.3.6 Zerebraler Stoffwechsel und Verhalten	13
1.3.7 Fokal segmentale Glomerulosklerose	14
1.3.8 Zusammenhang zwischen renaler Schädigung, Blutdruck und Proteinurie	15
1.3.9 Glomeruläre Hämodynamik	15
1.3.10 Entwicklung von renalen Schädigungen im Zusammenhang mit Manipulationen des Blutdruckes	16
1.3.11 Genetik	17
1.4 Der juxtaglomeruläre Apparat	17
1.4.1 Morphologie und Funktion	17
1.4.2 NO-Synthase im JGA	18
1.4.3 Prostaglandine im JGA	21
<b>2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b>	<b>24</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>25</b>
3.1 Versuchstiere	25
3.2 Perfusionsfixierung und Gewebsprozessierung	25
3.3 Morphologische Analyse	26
3.3.1 Anfertigung der Gewebsschnitte	26
3.3.2 Histopathologische Beurteilung	26
3.4 Histochemische Analyse	27
3.4.1 Diaphorase-Reaktion	27
3.4.2 Proteinnachweis durch Antikörperdetektion	27
3.4.3 In situ-Hybridisierung	29
3.5 Statistische Auswertung	32
3.5.1 Quantifizierung der Signale	32
3.5.2 Statistische Tests	32
<b>4 ERGEBNISSE</b>	<b>34</b>
4.1 Klinische Parameter	34



<b>4.2 Histopathologische Veränderungen</b>	<b>35</b>
4.2.1 Glomeruläre und interstitielle Veränderungen	35
4.2.2 Gefäßveränderungen	38
4.2.3 Quantifizierung der sklerotischen Läsionen	39
<b>4.3 Kollagen IV und Kollagen I</b>	<b>40</b>
<b>4.4 Natrium-Kalium-2-Chlorid-Kotransporter</b>	<b>41</b>
<b>4.5 Renin mRNA und Protein</b>	<b>43</b>
<b>4.6 NOS1-Proteinaktivität und mRNA-Expression</b>	<b>45</b>
<b>4.7 Cyclooxygenase 2-Protein</b>	<b>47</b>
<b>5 DISKUSSION</b>	<b>49</b>
<b>5.1 Morphologische Schäden</b>	<b>49</b>
5.1.1 Arteriopathie	49
5.1.2 Fokal segmentale Glomerulosklerose	49
5.1.3 Matrixexpression	50
<b>5.2 Hypertonus</b>	<b>51</b>
<b>5.3 Glomeruläre Hämodynamik der FHH-Ratte</b>	<b>51</b>
<b>5.4 Das RAS der FHH-Ratte</b>	<b>52</b>
<b>5.5 Regulation von MD NOS1 und COX-2 bei der FHH-Ratte</b>	<b>53</b>
<b>5.6 Genetik</b>	<b>54</b>
<b>5.7 Mögliche Zusammenhänge mit menschlicher FSGS</b>	<b>54</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>55</b>
<b>LITERATURVERZEICHNISS</b>	<b>56</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>68</b>
<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>69</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	<b>70</b>
<b>ANHANG A: PUBLIKATIONS LISTE</b>	<b>71</b>

## Im Text verwendete Abkürzungen

ACE - Angiotensin Converting Enzyme (Angiotensin-umwandelndes Enzym)  
ACI - August Copenhagen x Irish (Ratte)  
ADP - Adenosindiphosphat  
ATP - Adenosintriphosphat  
BSA - Bovine Serum Albumine (bovines Serumalbumin)  
cAMP - cyclic Adenosine Monophosphate (zyklisches Adenosinmonophosphat)  
cDNA - complementary DNA (komplementäre DNA)  
cGMP - cyclic Guanosine Monophosphate (zyklisches Guanosinmonophosphat)  
COX; COX-1/2 - Cyclooxygenase; Subtyp 1/2  
DCT - Distal Convoluted Tubule (distales Konvolut)  
DEPC - Diethyl-Pyrocarbonat  
DIG - Digoxigenin  
DNA - Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)  
dsDNA - double-stranded DNA (Doppelstrang-DNA)  
ERPF - Effective Renal Plasma Flow (effektiver renaler Plasmafluß)  
EUR - Erasmus Universität, Rotterdam  
FH - fawn-hooded (Ratte), Ratte mit ockerfarbener Kopfzeichnung  
FHH; FHH8, FHH16 - hypertensive fawn-hooded (Ratte); 8, 16 Wochen alt  
FHL; FHL16 - fawn-hooded (Ratte) mit nahezu normalem Blutdruck; 16 Wochen alt  
FSGS - Focal and Segmental Glomerulosclerosis (fokal-segmentale Glomerulosklerose)  
GFR - Glomerular Filtration Rate (glomeruläre Filtrationsrate)  
HIV - Human Immunodeficiency Virus (humanes Immundefizienzvirus)  
JGA - Juxtaglomerular Apparatus (juxtaglomerulärer Apparat)  
L-NAME - N(G)-Nitro-L-Argininmethylester  
MCD - Minimal Change Disease (Glomerulonephritis mit Minimalveränderungen)  
MD - Macula densa  
mRNA - messenger RNA (Boten-RNA)  
NADPH - Nikotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat  
NCC - Na-Cl-Kotransporter  
NKCC2 - Na-K-2Cl-Kotransporter  
NO - Stickstoffmonoxid  
NOS; NOS1, NOS3 - Nitric Oxide Synthase (NO-Synthase); Subtyp 1, 3  
NSS - Native Swine Serum (natives Schweineserum)  
PAS - Periodic Acid-Schiff (Perjodsäure-Schiff)

PBS - phosphate-buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)

PCR - Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)

PDE; PDE2, PDE3 - Phosphodiesterase; Subtyp 2, 3

PDGF - Platelet Derived Growth Factor (von Plättchen synthetisierter Wachstumsfaktor)

$P_{GC}$  - Glomerular Capillary Pressure (glomerulär-kapillärer Druck)

PRA - Plasma Renin Activity (Plasmareninaktivität)

$R_A$  - Resistance (Widerstand) der afferenten Arteriole

RAS - Renin-Angiotensin-System

RBF - Renal Blood Flow (renaler Blutfluß)

$R_E$  - Resistance (Widerstand) der efferenten Arteriole

RNA - Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)

RT-PCR - Reverse Transkriptase - PCR

SBP - Systolic Blood Pressure (systolischer Blutdruck)

SGC - soluble Guanylyl Cyclase (lösliche Guanylatzyklase)

SHR - Spontaneously Hypertensive Rats (spontan hypertensive Ratten)

SNGFR - Single Nephron GFR (GFR pro Einzelnephron)

SSC - Standard Sodium Citrate (NaCl-Citrat Puffer)

TAL - Thick Ascending Limb (dicker Schenkel der aufsteigenden Henle'schen Schleife)

TGF - Tubuloglomerulärer Feedback

TGF $\beta$  - Transforming Growth Factor  $\beta$  (transformierender Wachstumsfaktor  $\beta$ )

Tris - Trishydroxymethyl-aminomethan

t-RNA - Transcription RNA (Transkriptions-RNA)

$U_aV$  - Albuminexkretion im Urin

UNX - Uninephrektomie

$U_pV$  - Proteinexkretion im Urin

# **1 Einleitung**

## **1.1 Allgemein**

Erkrankungen der Niere sind heute verantwortlich für einen Großteil der Gesamtmorbidität weltweit mit vorwiegendem Auftreten in den hochentwickelten Ländern der westlichen Welt. Erkrankungen der Niere spielen in Mortalitätsstatistiken nur eine untergeordnete Rolle im Vergleich zum Krebs und zu den ischämischen Herzerkrankungen (aktuelle US-Daten: 35.000 Todesfälle/Jahr entfallen auf Nierenerkrankungen, hingegen 750.000/Jahr auf Herzerkrankungen und 400.000/Jahr auf Krebs). Die Signifikanz der Nierenerkrankung als solche liegt also weniger in der akuten Bedrohung des Lebens, die dank moderner Behandlungsstrategien wie Dialyse und Nierentransplantation minimiert werden konnte, sondern vielmehr in der massiven Einschränkung der Lebensqualität der von einer Niereninsuffizienz betroffenen Patienten und in den durch kostenintensivste Behandlungsstrategien hervorgerufenen immensen Belastungen für das Gesundheitssystem. Bei Betrachtung der Ursachen für substitutionsbedürftige Niereninsuffizienz findet man an erster Stelle der renalen Grundkrankheiten die heterogene Gruppe der Glomerulonephritiden mit 38,3%, gefolgt von den interstitiellen Nierenerkrankungen mit 23,3%, den Schädigungen der Niere bei Diabetes Mellitus (14,4%, stark ansteigend), den mit Hypertonie assoziierten vaskulären Nierenerkrankungen (8,6%) und den Zystennieren mit 8,5% (Prozentangaben aus dem Bericht der europäischen Gesellschaft für Dialyse und Transplantation). Bei der Mehrzahl der Krankheitsgruppen, die zur Niereninsuffizienz führen, steht also die Schädigung des Glomerulum (primär/sekundär und mit/ohne begleitende vaskuläre und interstitielle Veränderungen) ganz im Mittelpunkt des Geschehens.

## **1.2 Die fokal segmentale Glomerulosklerose beim Menschen**

### **1.2.1 Klassifikation und Häufigkeit**

Die fokal-segmentale Glomerulosklerose (FSGS) nimmt unter den glomerulären Schädigungen, die zu schweren Nierenerkrankungen führen, insofern eine Sonderstellung ein, als dass es sich bei ihr nicht um eine Krankheitsentität handelt. Vielmehr bietet eine große Gruppe heterogener Krankheitsbilder schließlich das pathologisch-anatomische Bild einer fokal segmentalen Glomerulosklerose. Seit der Erstbeschreibung der Morphologie der Erkrankung durch Arnold Rich [1957] und der Veröffentlichung von Churg und Koautoren [1970], die bereits das wissenschaftliche und klinische Interesse an der Erkrankung weckte, gab es zahlreiche Versuche die FSGS auf dem Boden morphologischer und funktioneller Unterschiede in verschiedene Subkategorien einzuteilen und den Ursachen für die glomeruläre Schädigung auf die Spur zu kommen. In der aktuellen Literatur finden sich eine Reihe teils stark divergierender Klassifikationen. Hier sei in Tabelle 1 verkürzt die am weitesten akzeptierte Einteilung, entnommen aus D'Agatis Übersicht zum Thema FSGS [1994], aufgeführt.

Tabelle 1: Klassifikation der fokal segmentalen Glomerulosklerose. Unterstrichen sind FSGS-Formen, bei denen dem initial vorliegenden glomerulären Hypertonus pathogenetisch eine entscheidende Rolle zukommt.

<b>(I) primäre (idiopathische) fokal-segmentale Glomerulosklerose</b> einschließlich sogenannter zellulärer (vermehrter) Varianten, der „collapsing“ Glomerulopathie, der FSGS mit diffuser mesangialer Hyperzellularität, der FSGS mit sogenannten „tip lesions“ (Anheftung des Gefäßknäuls im Bereich des Harnpols) und der FSGS mit Glomerulomegalie
<b>(II) sekundäre fokal-segmentale Glomerulosklerose</b> - <u>bei Reduktion der funktionfähigen renalen Masse</u> (durch unilaterale Nierenagenesie, Oligomeganephronie, renale Dysplasie, chirurgische Resektionen, kortikale Nekrosen und grundsätzlich durch jedwede renale Erkrankung, die zum ausgeprägten Verlust funktionsfähiger Nephrone führt) - <u>bei initial normaler renaler Masse</u> ( <u>Diabetes Mellitus</u> , <u>Hypertension</u> , Adipositas per magna, zyanotische kongenitale Herzerkrankungen, Sichelzellerkrankheit)
<b>(III) morphologisches FSGS-„Muster“ auf dem Boden renaler Narbenbildung</b> (durch eine Reihe von Glomerulonephritiden, durch EPH-Gestose, durch hereditäre Nephropathien)
<b>(IV) HIV-assoziierte Nephropathie</b>
<b>(V) Heroinnephropathie</b>

Aus der Tabelle geht hervor, dass es unter den einzelnen Subgruppen teils erhebliche Überschneidungen gibt, wie auch Überschneidungen von FSGS und anderen Nierenerkrankungen eher die Regel denn die Ausnahme bilden. Aus diesem Grund ist die Angabe des prozentualen Anteils der FSGS als Ursache für Niereninsuffizienz außerordentlich schwierig. Um die Bedeutung und Häufigkeit der Erkrankung zu betonen, seien hier die prozentualen Anteile der histologischen Diagnose FSGS in Nierenbiopsien von Patienten mit nephrotischem Syndrom aufgeführt (Tabelle 2, entnommen aus [Cameron 1996]).

Tabelle 2: Anteil von Patienten mit der histologischen Diagnose FSGS an der Gesamtheit der Patienten mit nephrotischem Syndrom, bei denen eine Biopsie durchgeführt wurde.

Alter	0-15	15-19	20-30	30-40	40-50	50-60	>60
% FSGS	7	19	18	11	27	16	2

Wesentlich stärker vertreten ist die Erkrankung in der schwarzen Bevölkerung. Fast 2/3 aller nephrotischen Syndrome bei erwachsenen Schwarzen [Bakir et al. 1989] und 1/3 derselben bei schwarzen Kindern [Ingulli und Tejani 1991] gehen zu Lasten der FSGS. Des weiteren existieren einige sehr seltene familiäre Formen der Erkrankung [Felldin et al. 1995], von denen ein Teil Mutationen auf Chromosom 19q13 aufweist [Mathis et al. 1998]. Dem vermehrten Vorkommen der FSGS im Rahmen von HIV-Infektionen [Cohen 1998] und bei Heroinabusus [Rao et al. 1974] ist schon durch die gesonderte Aufnahme dieser beiden Krankheiten in die Klassifikation der FSGS Rechnung getragen worden. Des weiteren gibt es Hinweise für einen Anstieg der Inzidenzen für FSGS [D'Agati 1994, Haas et al. 1995] in allen Altersgruppen in den letzten Jahren.

## 1.2.2 Morphologie

Für die histologische Diagnose FSGS wird verlangt, dass nur ein Teil der Glomerula einer Niere betroffen ist (fokal) und neben den geschädigten Glomerula auch morphologisch „gesunde“ Glomerula vorliegen. In den betroffenen Glomerula wiederum ist auch nur ein variabler Teil des glomerulären Gefäßknäuels von der Sklerose betroffen (segmental), während der Rest lichtmikroskopisch normal erscheint. Ansonsten bietet die FSGS eine außerordentlich heterogene Morphologie. Man unterscheidet zwischen der „klassischen“ Läsion mit vom vaskulären Pol ausgehenden Anhaftungen des Gefäßknäuels an die Bowmanmembran, Kollaps von Kapillaren und Matrixeinlagerung, der zellulären Läsion mit Akzentuierung der endokapillären und extrakapillären Proliferation, den „tip lesions“, bei denen die primäre Anheftung im Bereich des Harnpols nahe des Abgangs des proximalen Tubulus zu finden ist und den „collapsing“ Sklerosen, bei denen eine Verkleinerung des Gefäßknäuels mit Kollaps der Kapillaren ohne apparente Anheftung an die Bowmankapsel vorliegt. Letztere Morphologie gilt als relativ typisch für HIV- und Heroin-assoziierte FSGS, kommt allerdings auch in der Gruppe der primären FSGS vor. Mischformen zwischen den einzelnen morphologischen Varianten sind häufig und lassen im Regelfall keinen sicheren Rückschluss auf die zugrunde liegende Erkrankung zu. Für ausführlichere Beschreibungen der morphologischen Details der menschlichen FSGS sei auf die Übersichten von D'Agati [1994], Ichikawa und Fogo [1996] und Cameron [1996] verwiesen.

## 1.2.3 Pathogenese

Die genaue Ursache sowohl der primären als auch der sekundären Glomerulosklerosen ist bis heute unbekannt. Ebenso unbekannt ist trotz kontrovers geführter Diskussionen die Frage, ob die FSGS lediglich grundsätzlich eine fortgeschrittene Form der sogenannten „minimal change“ Krankheit (MCD) darstellt, oder ob es sich um zwei unabhängige Erkrankungen handelt (diskutiert in Mallick et al. 1997). Allerdings gibt es hinsichtlich der Pathogenese der Erkrankung eine Reihe von Hinweisen, die auf das komplexe Zusammenwirken hämodynamischer, serologischer, genetischer und viraler Faktoren bei einzelnen Formen hindeuten. Auf eine genetische Komponente deuten die erhöhte Erkrankungshäufigkeit in der schwarzen Bevölkerung und das Vorliegen hereditärer Formen hin. Eine direkte Beteiligung von Viren an der Pathogenese der Erkrankung ist bei der HIV-Nephropathie wahrscheinlich, wofür der Nachweis von HIV-Genom in glomerulären Zelltypen [Kimmel et al. 1993] und Befunde an verschiedenen Tiermodellen [Dickie et al. 1991, Poli et al. 1993] sprechen. Weiterhin ergaben sich Hinweise für eine Beteiligung von Wachstumsfaktoren an der Pathogenese der FSGS. So konnte nachgewiesen werden, dass das Vorliegen vergrößerter Glomerula bei Patienten mit einem erhöhtem Risiko für FSGS verknüpft ist [Vats et al. 1994]. Eine besondere Rolle kommt in diesem Zusammenhang wohl dem „Platlet Derived Growth Factor“ (PDGF) [Johnson 1994, Tanaka et al. 1995] und dem „Transforming Growth Factor  $\beta$ “ (TGF $\beta$ ) [Yamamoto et al. 1993, 1996, 1998] zu. Diese Hypothese ist um so attraktiver, als dass gezeigt werden konnte, dass die Expression dieser beiden Wachstumsfaktoren durch unterschiedliche Angiotensin II-Konzentrationen moduliert wird [Ketteler et al. 1995]. Des weiteren scheint bei der primären FSGS das Vorliegen eines von Lymphozyten produzierten, ca. 50 kDa großen, eventuell Zytokin-ähnlichen Faktors, der in der Lage ist, Podozyten direkt zu schädigen [Dantal et al. 1994, Savin et al. 1996], eine Rolle zu spielen. Für das Vorliegen eines Serumfaktors spricht auch die häufige Rekurrenz der Erkrankung im Nierentransplantat bei FSGS-Patienten. Worum es sich bei diesem Faktor handelt, was seine physiologische Funktion ist und warum er produziert wird, ist aber bis heute unbekannt. Von entscheidender Bedeutung für die Pathogenese von vielen sekundären, aber auch von der primären Form der FSGS ist eine initial vorliegende oder während der Erkrankung entstehende veränderte glomeruläre Hämodynamik, die zu einer Druckbelastung im Bereich des glomerulären Gefäßknäuels und zu Anhaftungen desselben an die Bowmankapsel führt. Hinweise für diese Hypothese ergaben sich schon früh aus einer Vielzahl von Tierversuchen [Hostetter et al. 1981, Brenner 1985]. Vor allem Dysregulationen des Tonus der afferenten und efferenten Arteriole, die ein zu starkes Durchschlagen des systemischen Blutdrucks in die glomeruläre Strombahn bewirken, scheinen in diesem Zusammenhang von Bedeutung zu sein. Besondere Beachtung verdient dieser Mechanismus bei auf dem Boden des Verlustes von funktionsfähigem Nierengewebe entstehender FSGS, bei hypertensiv bedingter FSGS und bei der diabetischen FSGS, da es sich bei diesen Formen vermutlich um das primär wirksame pathogenetische Prinzip handelt. Grundsätzlich kann dieser Mechanismus aber auch bei jeder

anderen Form der FSGS „aufgepfropft“ vorliegen und zu einer erheblichen Beschleunigung der Nierenschädigung führen. Die Ursachen dieser hämodynamischen Dysregulation am Glomerulum sind bis heute weitestgehend unbekannt.

#### 1.2.4 Prognose und Therapie

Die Prognose der Erkrankung ist im Vergleich zu anderen glomerulären Erkrankungen schlecht. Sie ist abhängig von einer Reihe von Faktoren. So spielen der klinische Zustand, in dem der Patient sich präsentiert, seine ethnische Zugehörigkeit, das Ansprechen auf die Therapie, die histologische Variante und viele andere Faktoren eine Rolle. Zur ausführlichen Darstellung der einzelnen Subgruppen sei auf die Übersicht von Korbet [1998] verwiesen. Von den Patienten, die bei Erstdiagnose bereits eine Proteinurie > 3g/24h aufwiesen, wurden ca 50% im Verlauf von 6-8 Jahren niereninsuffizient. Bei Erwachsenen, die unter Standardtherapie eine Komplettremission entwickelten, führte die Erkrankung nur in 2% der Fälle zum Nierenversagen innerhalb von 5 Jahren (Kinder 14% nach 6,1 Jahren), wohingegen 52% der nicht auf die Therapie ansprechenden Erwachsenen nach 5 Jahren (bei Kindern 37% nach 6,1 Jahren) niereninsuffizient wurden [Korbet et al 1994, Korbet 1998]. Die Standardtherapie beschränkt sich auch heute noch auf die Gabe von Glukokortikoiden (zunächst hochdosiert, dann über Monate in abnehmender Dosierung), bei steroidresistenten Fällen und Rückfällen werden häufig zusätzlich Zytostatika verabreicht, allerdings mit eher geringem Erfolg. Ob der protektive Effekt dieser Medikamente allein über eine Suppression des Immunsystems vermittelt wird oder ob andere, noch unbekannte Wirkungsweisen eine Rolle spielen, ist unklar. In einigen Fällen brachte auch die wiederholte Anwendung der Plasmapherese und der Einsatz nichtsteroidaler Antirheumatika Besserung. Zusätzlich zur Anwendung kommen Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE)-Inhibitoren, deren renoprotektiver Effekt in einer Vielzahl von Studien belegt ist. Die Antwort auf die Frage, ob die Behandlung der FSGS mit AT II-Rezeptorantagonisten der Behandlung mit ACE-Hemmern gleichwertig oder überlegen ist, bleibt zu klären. Auch die Frage, warum der Einsatz von ACE-Hemmern im Vergleich zu anderen Antihypertensiva einen sehr viel größeren Erfolg aufwies, ist ungeklärt.

### 1.3 Die „fawn-hooded“ Ratte

#### 1.3.1 Herkunft

Die „fawn-hooded“ (FH) Ratte entstand als ungeplante Kreuzung einer Reihe von Rattenstämmen (u.a. German-Brown, White-Lashley, Wistar und Long-Evans Ratten) in der Fakultät für Psychologie der Universität von Michigan, Ann Arbor, USA [Tschopp und Zucker 1972, Raymond und Dodds 1975]. Von dort wurde ein Teil der Tiere in den frühen 70er Jahren an das New York State Department of Health, Albany, USA verbracht und die Züchtung durch Geschwisterpaarung fortgeführt (FH/Wjd). Ein weiterer Teil der Tiere gelangte an das amerikanische Museum für nationale Geschichte in New York, wo die weitere zufällige Auszuchtung erfolgte. Die dort gehaltenen Tiere bildeten die Basis für einen in der Schweiz im Institut für biologische und medizinische Forschung in Fullinsdorf ebenfalls durch Auskreuzung fortgeführten Ableger. Von dort gelangte eine Kolonie der Tiere in die Unilever Forschungslaboratorien in Vlaardingen, Niederlande, wo der Stamm durch Auszucht bis 1990 fortgeführt wurde (FH/URL). 1981 fiel erstmals auf, dass die Tiere einen moderaten spontanen Hypertonus entwickelten und Proteinexkretion im Urin zeigten [Kuijpers 1981]. Auf der Basis von Blutdruckwerten und Proteinexkretion im Urin wurde jeweils eine Gruppe mit niedrigem Blutdruck und geringer Proteinexkretion und eine Gruppe mit hohem Blutdruck und hoher Proteinexkretion gebildet [Provoost 1994] und Mitte der 80er Jahre durch Inzucht getrennt. Tiere beider Gruppen wurden 1990 an die Erasmus Universität Rotterdam verbracht und die Zucht wurde durch Geschwisterpaarung fortgeführt. Der Rattenstamm mit dem höheren Blutdruck erhielt den Namen FHH/EUR (in dieser Studie lediglich mit FHH bezeichnet), der Stamm mit dem niedrigeren Blutdruck den Namen FHL/EUR (in dieser Studie FHL). Für weitergehende Information zur Herkunft der „fawn-hooded“ Ratte sei noch auf Kuijpers [1986] und Magro und Koautoren [1986] verwiesen. Angemerkt sei auch, dass zur Zeit insgesamt noch mindestens 5 unterschiedliche FH-Stämme in der experimentellen Forschung

Verwendung finden (FH-Ratten des amerikanischen Museums für nationale Geschichte, FH/Wjd, FH/URL, FHH/EUR, FHL/EUR und die nur teilweise verwandten FH/Iowa Reactive), die sich sowohl genetisch, physiologisch und verhaltenspsychologisch trotz naher Verwandtschaft in einigen Punkten unterscheiden [Provoost 1994, Overstreet und Rezvani 1996, Provoost et al. 1998]. In der vorliegenden Arbeit wurde soweit aus der Literatur ersichtlich immer die korrekte Stammbezeichnung verwendet, die durch Auszucht fortgeführten Linien der FH/URL bzw. der FH-Ratten des Museums für amerikanische Geschichte werden als FH-Ratten bezeichnet.

### 1.3.2 Systemischer Hypertonus

Schon 8 Wochen alte FH-Ratten wiesen einen systemischen Hochdruck auf, der im Alter weiter anstieg [Kuijpers und Gruys 1984, Kuijpers und de Jong 1986]. Die Hochdruckwerte schwankten zwischen 140 und 160 mmHg systolisch bei unterschiedlichen Messungen/Messmethoden und stiegen im Alter von einem Jahr bis auf Werte von über 220 mmHg systolisch an. Untersuchungen an FHH und FHL-Ratten zeigten systolische Werte von um die 150 mmHg für 8 Wochen und 16 Wochen alte FHH-Ratten und systolische Werte um 125 mmHg für 16 Wochen alte FHL-Ratten. Der systolische Blutdruck der FHL-Ratte ist also im Vergleich zu normotensiven Rattenstämmen immer noch leicht erhöht [Simons et al. 1993, van Dokkum et al. 1997, van Dokkum et al. 1998]. Die Ursache der Blutdruckerhöhung der FHH-Ratte ist bis heute unbekannt, obwohl einiges für eine ätiologisch noch unklare Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) spricht. So fanden Jung und Koautoren [1993] eine Erhöhung der systemischen und intrarenalen Reninspiegel bei jungen FHH-Ratten. Einige ältere, allerdings an mit der FHH-Ratte lediglich verwandten FH/Wjd-Ratten durchgeführte Untersuchungen [Magro et al. 1982, Kuijpers und de Jong 1987] erbrachten bezüglich des RAS konträre Ergebnisse. Verschiedene hypertensive FH-Rattenstämme wiesen eine erhöhte tägliche Wasseraufnahme und eine erhöhte Urin- und Salzausscheidung auf [Gilboa et al. 1984, Provoost und de Keijzer 1989]. Des weiteren ließ sich bei FH/Wjd-Ratten eine verminderte Kallikreinausscheidung [Gilboa et al. 1984] im Urin nachweisen. In der gleichen Studie konnte auch gezeigt werden, dass die Plasmareninaktivität und die Plasma-Angiotensin II-Spiegel bei FH/Wjd-Ratten signifikant mit dem Vorliegen der aktivierten Form von Kallikrein und der Umwandlungsrate von inaktivem zu aktivem Kallikrein korrelieren. Jung und Koautoren [1995] berichteten außerdem über eine im Vergleich zu Kontrollratten vermehrte Expression von AT II<sub>1</sub>-Rezeptor und eine vermehrte renale Synthese von Angiotensinogen und Angiotensin-Converting-Enzyme bei FHH-Ratten. Zusätzlich ließen sich in FH/Wjd-Ratten erhöhte Noradrenalin und Dopaminspiegel im Urin feststellen [Magro et al. 1986]. Auf eine gesteigerte renale Prostaglandinsynthese wiesen Untersuchungen von de Keijzer und Koautoren [1992] hin, die im Vergleich zu Kontrollratten erhöhte Urinwerte für Thromboxan B<sub>2</sub>, für Prostaglandin E<sub>2</sub> und Prostaglandin F<sub>1</sub>α bei FH-Ratten ergaben. Das Problem, wie diese verwirrende Vielfalt von Veränderungen vasoaktiver Substanzen bei FH-Rattenstämmen in ein schlüssiges Gesamtkonzept zu bringen ist, bleibt zunächst ungelöst, zu möglichen Erklärungsansätzen sei auf Kapitel 5 verwiesen.



### 1.3.3 Pulmonaler Hypertonus

Sowohl in FH/Wjd-Ratten [Kentera et al. 1988], als auch in FH/Iowa Reactive-Ratten [Sato et al. 1992] wurde im Vergleich zu Kontrollstämmen ein erhöhter pulmonalarterieller Druck nachgewiesen, der einherging mit einer verminderten kardialen Auswurfleistung. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich der pulmonale Druck durch Sauerstoffexposition normalisieren ließ [Sato et al. 1992]. Ob der gestörten Autoregulation der Pulmonalgefäße und der unten ausführlich dargestellten Störung der renalen Hämodynamik ein gemeinsames pathophysiologisches Prinzip zugrunde liegt, bleibt zu klären.

### 1.3.4 Proteinexkretion im Urin

Schon früh konnte nachgewiesen werden, dass verschiedene FH-Rattenstämme eine signifikante Proteinurie aufwiesen, die mit dem Alter anstieg [Kreisberg und Karnovsky 1978, Urizar et al. 1984, Provoost und de Keijzer 1989] und die positiv mit der Höhe des systemischen Blutdrucks korreliert war. Für FHH-Ratten wurden Werte von um die 25mg/24h im Alter von 3 Wochen, über 54mg/24h im Alter von 11 Wochen gemessen, die bei zunehmendem Alter weiter auf Werte von über 200mg/24h anstiegen [Simons et al. 1993, van Dokkum et al. 1998]. Im Gegensatz dazu blieb die Proteinkonzentration im Urin von FHL-Ratten im Verlauf ihres Lebens konstant unter 10 mg/24h [van Dokkum et al. 1997, Provoost et al. 1998]. Simons und Koautoren [1993], ebenso wie Oliver und Koautoren [1994] bewiesen, dass es sich bei dem von FH-Ratten ausgeschiedenen Protein in erster Linie um Albumin handelt. Hierzu paßt auch die erhöhte Clearance für Ficoll bei FH-Ratten im Vergleich zu Kontrollstämmen [Oliver et al. 1994], die weniger auf eine Größenselektivitätsstörung, als auf eine Störung der Ladungselektivität an der Basalmembran von hypertensiven FH-Ratten hindeutet.

### 1.3.5 Plättchendysfunktion

Eine leichte, kongenitale Blutungsneigung war die erste an FH-Ratten entdeckte Abnormalität [Raymond und Dodds 1975]. Die mild ausgeprägte, hämorrhagische Diathese konnte zurückgeführt werden auf verminderte thrombozytäre Konzentrationen von Serotonin, ADP und ATP [Tschopp und Weiss 1974, Sweeney und Needleman 1979] und eine verminderte Stimulierbarkeit der Ausschüttung von ADP, ATP und Serotonin. Weiter konnten Defekte im Bereich thrombozytärer membranöser Glykoproteine nachgewiesen werden [Kirchmaier et al. 1990]. Die Plättchendysfunktion der FH-Ratten ähnelt thrombozytären Störungen bei Patienten mit chronischen Nierenkrankheiten [Gawaz et al. 1993].

### 1.3.6 Zerebraler Stoffwechsel und Verhalten

Joseph [1978] beschrieb erstmals Abnormitäten im zerebralen Serotonin und Tryptophanstoffwechsel der FH-Ratten, was zu weiterführenden Studien [Daoust et al. 1991] und zur Nutzung der FH-Ratten als genetisches Modell für menschliche, auf Dysregulationen im Serotoninstoffwechsel beruhende psychiatrische Störungen wie Depression [Overstreet et al. 1992], Eßstörungen [Aulakh et al. 1988] und Angststörungen [Altemus et al. 1994] führte. Einer weiteren Nutzung der FH-Ratten in der experimentellen psychiatrischen Forschung lagen Beobachtungen zu Grunde, die darauf hindeuteten, dass es sich bei ihnen um ein Rattenmodell für Alkoholpräferenz und Sucht handeln könnte [Badishtov et al. 1995, McMillen und Williams 1995].

### 1.3.7 Fokal segmentale Glomerulosklerose

Erstmals beschrieben wurden renale Schäden bei männlichen FH/Wjd-Ratten von Kreisberg und Karnovsky [1978]. Die Untersucher berichteten über eine bei zunehmendem Alter verstärkt auftretende FSGS und sich parallel dazu entwickelnde Proteinausscheidung im Urin von 3 bis 12 Monate alten Ratten. Diese Befunde bestätigten Magro und Rudovsky [1982]. Beide Studien stellten darüber hinaus fest, dass bei weiblichen FH-Ratten die Entwicklung der FSGS verzögert einsetzt, aber grundsätzlich nach den gleichen Gesetzmäßigkeiten abläuft. Dies impliziert einen protektiven Effekt von Östrogenen. Ein das Krankheitsgeschehen aggravierender Effekt von Androgenen schien unwahrscheinlich, da Gonadektomie den Krankheitsverlauf nicht beeinflusste [Provoost et al. 1998]. Urizar und Koautoren [1984] fanden schon in den Glomerula von 8 Wochen alten FH/Wjd Ratten Veränderungen im Sinne einer segmentalen, mesangialen Hyperplasie mit vermehrter Argyrophilie. Die pathologisch-anatomische Sequenz, die schließlich zur endgültigen Sklerosierung des Glomerulum führt, beschrieben Kriz und Koautoren [1996, 1998, 1999]. In diesen exzellenten morphologischen Studien zeigte sich, dass bei FHH-Ratten die Sklerose grundsätzlich am vaskulären Pol des Glomerulum beginnt, mit einer Aufweitung und Entfaltung eines Primärastes der afferenten Arteriole. Die dem erhöhten glomerulären Kapillardruck (siehe folgender Absatz) entgegenwirkenden Kräfte, wie die Verankerung der Basalmembran im Mesangium, und die von außen Gegendruck ausübenden podozytären Fußfortsätze sehen sich einer vermehrten Belastung ausgesetzt, was zu einer weiteren Entfaltung der Kapillaren und damit entsprechend dem Laplace'schen Gesetz zu verstärkter Wandspannung führt. Die glomeruläre Basalmembran verliert ihre Verankerung im Mesangium und die Podozyten entwickeln aufgrund der hohen Druckbelastung Schädigungszeichen wie Simplifizierung ihrer Fußfortsätze und Vakuolenbildung und heben sich schließlich von der glomerulären Basalmembran ab. Die denudierte Basalmembran heftet sich in der Folge an das parietale Epithel der Bowmankapsel. Anstatt in den Harnraum wird von den angehefteten und teils noch perfundierten Kapillaren nun in das periglomeruläre Bindegewebe unter das parietale Epithel filtriert, was zur Bildung eines paraglomerulären Raumes und zum unvermeidlichen Fortschreiten der Sklerose führt. Unterstützt wird dieser Prozeß durch Matrixeinlagerungen im sklerotischen Bereich, durch Kollaps der Kapillaren und fortschreitenden Verlust von Podozyten an den Grenzen des sklerotischen Areals. Des weiteren breitet sich dieser paraglomeruläre Raum auch über die Grenzen des Glomerulum unter dem proximalen Tubulusepithel aus. Inwiefern dieser Mechanismus zu den auftretenden interstitiellen Schäden im Rahmen der FSGS beiträgt, bleibt zu klären. Interessant ist die Beobachtung, dass die Entwicklung von menschlicher FSGS nach einem ähnlichen Sequenzmuster abläuft [Kriz et al. 1998]. Während sich in immunhistologischen Studien bei 3 Wochen alten FH-Ratten keinerlei Ablagerungen im Glomerulum nachweisen ließen, zeigten 5 Wochen alte FH-Ratten entlang der glomerulären Kapillaren und im Mesangium Ablagerungen von IgA und IgG. Mit zunehmendem Alter ließen sich variabel zusätzliche Ablagerungen von IgM, C3 und Fibrinogen nachweisen, konzentriert vor allem in sklerotischen Arealen. Zusätzlich zeigten sich mit dem Alter zunehmende Ablagerungen von von Willebrandt-Faktor und Fibronectin [Urizar et al. 1984, Kuijpers und Gruys 1984]. Ob diese Ablagerungen initial pathogenetisch von Bedeutung sind, ist allerdings zweifelhaft, wahrscheinlicher ist, dass es sich um Ablagerungen handelt, die bei zunehmender Schädigung der Funktionseinheit aus glomerulärer Basalmembran, Podozyten und Endothelien durch Filtration in das Mesangium und die sklerotischen Areale gelangen, hier allerdings durch immunologische Mechanismen zur Aggravierung der Schäden beitragen können. Erwähnt sei in diesem Zusammenhang noch, dass sich im Plasma von FH-Ratten nur vereinzelt Immunkomplexe und keine dsDNA-Antikörper nachweisen ließen. Zu Veränderungen der Zusammensetzung der Matrixkomponenten wie Kollagen und Laminin im Bereich sklerotischer Glomerula von FH-Rattenstämmen liegen keine Daten vor. In der durchschnittlichen Größe des glomerulären Gefäßknäules zeigten sich bei FHH- und FHL-Ratten im Vergleich zu anderen Rattenstämmen keine Unterschiede [Simons et al. 1993].

### 1.3.8 Zusammenhang zwischen renaler Schädigung, Blutdruck und Proteinurie

In der FHH-Ratte besteht eine signifikante Korrelation zwischen systolischem Blutdruck,  $U_pV$  und der Entwicklung glomerulärer Läsionen [Simons et al 1994]. Ähnliche Befunde liegen auch für FH/URL Ratten vor [Kuijpers et al. 1986, Kuijpers und de Jong 1987]. Die Entwicklung von Nierenschädigung und Proteinurie der FH-Ratte wird durch unilaterale Nephrektomie (UNX) und durch eine proteinreiche Diät signifikant beschleunigt [de Keijzer und Provoost 1990, Simons et al. 1993]. Bei FH/Wjd Ratten zeigte sich im Vergleich zur FHH-Ratte nach UNX eine sich noch schneller entwickelnde Proteinurie. FHL-Ratten entwickelten zwar nach UNX ebenfalls eine geringe Proteinurie und leichte glomeruläre Schädigungen, diese blieben aber im Verlauf stabil. FH/Iowa Reactive entwickelten weder Proteinurie noch renale Schäden nach UNX. Der systolische Blutdruck blieb bei allen Stämmen trotz UNX konstant [Provoost et al. 1998]. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die ebenfalls untersuchten SHR-Ratten trotz exzessiv gesteigertem Blutdruck und UNX keinerlei glomeruläre Schäden und keine Proteinurie entwickelten. Transplantationsstudien zeigten, dass lediglich die renale Schädigung, nicht aber der erhöhte systemische Blutdruck mit den Nieren von FHH-Ratten wandern. Dies deutet auf eine intrarenale Ursache für die Entstehung der FSGS [Kouwenhoven et al. 1999].

### 1.3.9 Glomeruläre Hämodynamik

De Keijzer und Provoost [1992] wiesen erstmals eine gesteigerte glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bei normalem effektiven renalen Plasmafluß (ERPF) bei FH-Ratten im Vergleich zu Wistar-Kontrollratten nach. Bei gleicher Anzahl von Glomerula ließen diese Befunde den Rückschluß auf eine erhöhte glomeruläre Filtrationsrate pro Einzelnephron (SNGFR) zu. Diese Befunde wurden durch Mikropunktionsstudien [Simons et al. 1993] bestätigt, die eine deutliche Erhöhung der SNGFR und des glomerulären Druck ( $P_{GC}$ ) von 12 und 22 Wochen alten FHH-Ratten im Vergleich zu gleichalten FHL-Ratten und Wistar-Kontrollratten ergaben. Als Ursache für die Erhöhung fand sich eine erhöhte Resistance der efferenten Arteriole ( $R_E$ ) und eine im Verhältnis zum  $P_{GC}$  zu niedrige Resistance der afferenten Arteriole ( $R_A$ ). Diese Kombination ließ ein ungehindertes Wirken des systemischen Drucks auf das glomeruläre Kapillarbett zu, bei ungenügender Kontrolle durch Tonuserhöhung an der afferenten Arteriole. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch Studien, die zeigten, dass der  $P_{GC}$  der FHH-Ratte direkt mit der Höhe des systolischen Blutdrucks der Tiere korreliert [Simons et al. 1994]. Einen weiteren wichtigen Hinweis auf Dysregulationen im Bereich der afferenten Arteriole boten Experimente, die nach UNX an FHH-Ratten den erwarteten weiteren Anstieg des  $P_{GC}$  aber im Gegensatz zum erwarteten protektiven Anstieg der  $R_A$  einen Abfall derselben nachwiesen [Simons et al. 1993]. Verseput und Koautoren [1998] bestätigten diese Ergebnisse durch Messungen an 11 und 26 Monate alten FHH-Ratten. In der gleichen Studie berichteten die Autoren über eine in absoluten Werten mit anderen Rattenstämmen vergleichbare TGF-Aktivität bei unterschiedlichen Perfusionsdrücken am Glomerulum. In Anbetracht des bei FHH-Ratten vorliegenden glomerulären Hypertonus muß die Kontrolle des Tonus der afferenten Arteriole durch den TGF allerdings als ungenügend betrachtet werden [Verseput et al. 1998]. Durch Gabe von ACE-Hemmern ließ sich bei gleichzeitigem Abfall von  $R_A$  und  $R_E$  der  $P_{GC}$  normalisieren. Weiter gestützt wurden diese Ergebnisse durch Studien von van Dokkum und Koautoren [1999], die bei FHH-Ratten eine gestörte Autoregulation von GFR und renalem Blutfluß (RBF) bei unterschiedlichen renalen Perfusionsdrücken aufzeigten. Während die an FHL-Ratten erhobenen Werte denen von Kontrollratten glichen, lagen bei FHH-Ratten ein erhöhter basaler RBF, eine erhöhte GFR und eine inadäquate Erhöhung des RBF und der Proteinurie bei Steigerung des renalen Perfusionsdruckes vor. Pathologische Werte für die Kontrolle von RBF und GFR fanden sich auch unter Salzbelastung und Salzzug bei FHH-Ratten, nicht jedoch bei FHL-Ratten [van Dokkum et al. 1999]. In der gleichen Arbeit wiesen die Autoren durch Perfusion von isolierten Interlobulararterien von FHH- und FHL-Ratten eine gestörte myogene Kontraktionskomponente der Gefäße der FHH-Ratten nach. Durch Anheben des Perfusionsdruckes von 70 auf 120 mmHg konnte bei FHH-Ratten eine Einengung des Lumens um nur 10% beobachtet werden, während die Gefäße von FHL-Ratten ihren Durchmesser bei gleichem Druckanstieg um über 15% verkleinerten. Hieraus schlossen die Autoren, dass eine gestörte myogene Antwort der präglomerulären Gefäße auf gesteigerten Perfusionsdruck bei FHH-Ratten maßgeblich an der

Entstehung des glomerulären Hypertonus beteiligt sei [van Dokkum et al. 1999].

### 1.3.10 Entwicklung von renalen Schädigungen im Zusammenhang mit Manipulationen des Blutdruckes

Die naheliegende Vermutung, dass die Erhöhung des Blutdruckes der FH-Ratten ebenfalls auf der oben erwähnten Störung des Serotoninstoffwechsels beruht, erscheint unwahrscheinlich, da sich durch Behandlung mit Serotoninrezeptorantagonisten weder der Blutdruck noch das  $U_pV$  normalisieren ließen [Weening et al. 1990]. Eine Reihe von Versuchen beschäftigte sich mit der Frage, ob gängige antihypertensive Medikamente einen Einfluß auf Blutdruck,  $U_pV$  und glomeruläre Schädigung bei der FHH-Ratte und verwandten Rattenstämmen zeigen. Bei Experimenten an FH/Wjd Ratten [Magro et al. 1986] zeigte sich, dass die Blutdruckkontrolle mit ACE-Inhibitoren im Hinblick auf eine Normalisierung des Hypertonus effektiver war als die Behandlung mit Furosemid oder Nifedipin. Diese Ergebnisse bestätigten Westenend und Koautoren [1992] an FH-Ratten und Verseput und Koautoren [1998, 2000] an FHH-Ratten. Die letztgenannten Studien zeigten darüber hinaus, dass durch rechtzeitiges Einsetzen der Behandlung mit ACE-Hemmern die Entstehung von glomerulären Schädigungen vollständig verhindert werden kann. Die Autoren beobachteten unter der Behandlung mit ACE-Inhibitoren eine Normalisierung des systemischen Druckes ebenso wie des  $P_{GC}$ . Kurzzeitbehandlung mit ACE-Hemmern (2 Wochen) verzögerte allerdings nur das Auftreten der FSGS um den entsprechenden Behandlungszeitraum. Auch konnte durch ACE-Inhibitorenbehandlung bei Ratten mit schon manifester FSGS das weitere Fortschreiten der Erkrankung nicht verhindert, wohl aber verzögert werden. Die Beobachtung, dass zwar neben den ACE-Hemmern eine Reihe weiterer Antihypertensiva zu einer adäquaten Blutdrucksenkung in FHH-Ratten führte, aber einen im Vergleich zu den ACE-Inhibitoren erheblich geringeren Schutz vor der Entstehung glomerulärer Schädigung bot, legte die Vermutung nahe, dass andere, vermutlich direkt an der Niere zur Wirkung kommende Effekte der ACE-Inhibitoren zum Tragen kommen müssen. Gestützt wurde diese Vermutung durch Beobachtungen an mit ACE-Hemmern behandelten FHH-Ratten mit UNX, die zeigten, dass zwischen der Normalisierung des Blutdruckes und dem Rückgang des  $U_pV$  durchschnittlich eine Woche verging [Simons et al. 1993, Oliver et al. 1994], wofür die Autoren einen zusätzlich zur Blutdrucksenkung auftretenden positiven Effekt auf die Ladungsselektivität der Filtrationsbarriere verantwortlich machten. Weitere Hinweise für zusätzlich renoprotektive Effekte von ACE-Hemmern ergaben sich bei Verseput und Koautoren [1997], die zeigen konnten, dass unterschiedliche Kombinationen von Antihypertensiva zwar eine vergleichbare Wirkung im Hinblick auf die Blutdrucksenkung erbrachten, aber die glomeruläre Schädigung (und die  $U_pV$ ) in sehr unterschiedlicher Weise beeinflusst wurde. Sie äußerten die Vermutung, dass der zusätzlich protektive Effekt von ACE-Hemmern auf einer Senkung intrarenaler Angiotensin II-Spiegel und einem normalisierenden Effekt auf die glomeruläre Hämodynamik beruhen könnte. Da sich bei Behandlung mit  $AT_1$ -Rezeptorantagonisten und ACE-Hemmern vergleichbar positive Ergebnisse im Hinblick auf Nierenfunktion und Blutdruck ergaben [Mackenzie et al. 1995, Ziai et al. 1996], liegt die Annahme nahe, dass die aggravierenden Effekte des stimulierten RAS auf die renale Funktion der FHH-Ratte in erster Linie über den  $AT_1$ -Rezeptor vermittelt werden. Weiterhin liegen Studien vor, die nicht den Effekt einer Blutdrucksenkung, sondern den Effekt einer Blutdrucksteigerung an FHH und FHL-Ratten untersuchten. Hierzu wurden FHH und FHL-Ratten unterschiedlichen Alters mit und ohne vorhergehende UNX mit dem NO-Inhibitor N(G)-Nitro-L-Argininmethylester (L-NAME) behandelt [Simons et al. 1994, van Dokkum et al. 1997, 1998, 1999]. Hierbei zeigte sich in den mit L-NAME behandelten Ratten im Vergleich zu nicht behandelten Kontrollen eine Abnahme von RBF, GFR und SNGFR bei gleichzeitiger Erhöhung von  $R_A$ ,  $R_E$ ,  $P_{GC}$  und Blutdruck. Die Entwicklung einer massiven Proteinurie und das Entstehen von glomerulären Schädigungen erfolgte stark beschleunigt, FHH-Ratten mit Hochdosisbehandlung lebten kürzer als 11 Wochen. August Copenhagen x Irish (ACI) Ratten zeigten unter L-NAME-Applikation einen erheblich geringeren Anstieg von Albuminurie ( $U_aV$ ) und glomerulärer Schädigung als FHH-Ratten bei gleich stark ausgeprägter Blutdruckerhöhung. FHL-Ratten und FHH/ACI-gekreuzte Ratten wiesen zwar unter L-NAME Behandlung einen schnelleren Anstieg des  $U_aV$  als ACI-Ratten auf, zeigten sich aber deutlich resistenter gegen die Blutdruckerhöhung als FHH-Ratten. Aus diesen Ergebnissen schlossen die Autoren auf eine vom Blutdruck unabhängige, hereditäre Komponente bei der Entstehung der renalen Schädigung. Ein zusätzlich zur Blutdruckerhöhung direkt die Niere schädigender Effekt sollte durch Behandlung mit L-NAME bei gleichzeitiger Normalisierung des Blutdruckes durch ACE-Hemmer ausgeschlossen werden. Tatsächlich zeigten die entsprechend behandelten Tiere keine im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen gesteigerte Entwicklung einer Albuminurie als Zeichen einer

glomerulären Schädigung [van Dokkum et al. 1999]. Allerdings muß darauf hingewiesen werden, dass natürlich die weiter oben geschilderten, zusätzlich zur Blutdrucksenkung wirksamen renoprotektiven Effekte des ACE-Hemmers einen zusätzlich zur Blutdrucksteigerung schädigenden Effekt von L-NAME maskieren könnten. Die vielfältigen möglichen Interaktionen von RAS und NO lassen also keinen endgültigen Schluß im Bezug auf die Ätiologie der durch L-NAME-Wirkung verursachten Schädigung in der FHH/FHL-Ratte zu.

### 1.3.11 Genetik

Erste genetische Studien von La Vail [1981] charakterisierten die Gene, die die Farbe der FH-Ratte determinieren. Die Ocker(fawn)-Färbung des Kopfbereiches beruht auf dem homozygoten Vorhandensein des autosomal rezessiv vererbten Red-Eyed-Dilution-Genes [LaVail 1981, Prieur und Meyers 1984]. Ausgehend von diesen bekannten Genen führten Kreuzungsversuche von FHH und ACI-Ratten [Brown et al. 1996, 1998] zur Identifikation einiger signifikant mit der Entstehung von Bluthochdruck und renaler Schädigung bei der FHH-Ratte korrelierter Genloci. So fand sich auf Chromosom 1 ein *Rf-1* genanntes für 50% der Varianzen der morphologischen Läsionen verantwortliches Gen. Ratten, die homozygot für *Rf-1* waren, zeigten eine doppelt so hohe Albuminurie wie heterozygote Tiere. Eine Korrelation des Genes zur Höhe des Blutdruckes bestand nicht. Ein weiteres, allerdings schwächer mit  $U_{aV}$  und renaler Schädigung korreliertes Gen (*Rf-2*) wurde ebenfalls auf Chromosom 1 nachgewiesen. Dieses Gen zeigte auch eine schwache Korrelation zur Höhe des Blutdruckes. Ein zusätzliches, ebenfalls auf Chromosom 1 gelegenes *Bpfh-1* benanntes Gen zeigte eine starke Korrelation zur Höhe des Blutdruckes, nicht jedoch zur Höhe der Albuminurie oder zum morphologischen Sklerosenscore. Die Autoren schlossen daraus, dass die Tendenz eine glomeruläre Schädigung zu entwickeln und die Neigung zum Hypertonus bei der FHH-Ratte genetisch unabhängig voneinander determiniert sein müßten. Ähnlich wie bei dem Risiko, eine FSGS zu entwickeln (siehe 1.3.7), ergaben sich zwischen männlichen und weiblichen Ratten allerdings auch genetische Unterschiede. So konnte bei weiblichen FHH-Ratten kein Zusammenhang zwischen dem homozygoten Auftreten von *Rf-2* und der Höhe der Albuminurie festgestellt werden. Gleiches galt für den Zusammenhang von *Bpfh-1* und Blutdruck. Stattdessen fand sich eine Korrelation eines weiteren Genortes auf Chromosom 1 mit dem Auftreten von erhöhten Blutdruckwerten [Brown et al. 1998]. In weiterführenden Studien von Shiozawa und Koautoren [1998] bestätigten sich diese Ergebnisse. Zusätzlich konnten noch weitere Genorte auf Chromosom 3 (*Rf-3*), Chromosom 14 (*Rf-4*) und Chromosom 17 (*Rf-5*) nachgewiesen werden, die mit dem Auftreten von Albuminurie und renaler Schädigung korreliert waren. Auf Chromosom 17 fand sich außerdem ein *Bpfh-2* genannter Locus, der Verbindung mit der Ausprägung des Hypertonus aufwies. Den stärksten Einfluß auf die Entwicklung einer Albuminurie hatte allerdings (analog zur Risikoverteilung für FSGS) *Rf-1*. Zwar entwickelten für *Rf-1* homozygote Tiere, die gleichzeitig zumindest heterozygot für alle anderen *Rf*-Loci waren, keine Proteinurie, sobald allerdings zusätzlich zu *Rf-1* zumindest auf einem weiteren *Rf*-Locus Homozygotie vorlag, ließen sich schwere renale Schädigungen nachweisen.

## 1.4 Der juxtaglomeruläre Apparat

### 1.4.1 Morphologie und Funktion

Mit dem Terminus „juxtaglomerulärer Apparat“ (JGA) wird eine Funktionseinheit des Nephrons von Säugetieren beschrieben. Der JGA besteht aus den Glomerulumgefäßen, dem extraglomerulären Mesangium und der Macula densa (MD). Unter Macula densa versteht man eine Gruppe von Epithelien im dicken Teil der aufsteigenden Henleschen Schleife (TAL), die sich sowohl morphologisch als auch funktionell vom übrigen Tubulusepithel im TAL unterscheidet. Die MD liegt in direkter Nachbarschaft zu afferenter und efferenter Arteriole am Gefäßpol des Glomerulum. Am JGA besteht somit der einzige direkte Kontakt zwischen den das einzelne Glomerulum versorgenden Gefäßen und dem aus demselben Glomerulum hervorgehenden Tubulussystem. Funktionell ließ sich nachweisen, dass es sich beim JGA um ein hochsensibles Meß- und Regelsystem zum Erhalt der Salzhomöostase und zur Regulation der renalen und systemischen Hämodynamik handelt. Es zeigte sich, dass

Veränderungen der NaCl-Konzentrationen in der die MD passierenden Tubulusflüssigkeit zwei essentielle Effekte hervorrufen. So führt eine erhöhte NaCl-Konzentration an der MD zu einer Kontraktion der glatten Muskelzellen des Vas afferens und damit zu einem Abfall von glomerulärem Blutfluß,  $P_{GC}$  und SNGFR des entsprechenden Glomerulum [Schnermann und Briggs 1992]. Hierdurch erniedrigt sich die Konzentration von NaCl an der MD des zugehörigen Nephrons. Umgekehrt führt ein Abfall der tubulären NaCl-Konzentration an der MD zu einer Relaxation der afferenten Arteriole und folglich zu einem Anstieg von SNGFR,  $P_{GC}$  und zu nachfolgend höheren NaCl-Konzentrationen an der MD. Dieser negative Rückkopplungsmechanismus wird „tubuloglomerulärer Feedback“ (TGF) genannt. Die Regulation des Tonus der afferenten Arteriole durch sich ändernde NaCl-Konzentration erfolgt nicht linear, sondern zeigt die größte Sensitivität im Bereich physiologischer NaCl-Konzentrationen [Briggs et al. 1984]. Der TGF reagiert auf Erhöhungen und auf Erniedrigungen der Salzkonzentration an der MD mit gleicher Effektivität [Thomson und Blantz 1993]. Die Reaktionszeit des TGF auf veränderte Salzkonzentrationen an der MD liegt im Sekunden- bis Minutenbereich. Allerdings stellt sich bei längerfristigen Veränderungen der Salzkonzentrationen an der MD ein Resetting des TGF ein, was bedeutet, dass zwar die Regulationsamplituden des TGF erhalten bleiben, dieser aber nun, von einer höheren (oder niedrigeren) Salzkonzentration ausgehend, den Tonus der afferenten Arteriole reguliert. Funktionell bedeutet dies, dass der TGF in der Lage ist kurzfristige Schwankungen in Perfusionsdruck und GFR auf der Ebene der Einzelnephrone zu regulieren und somit unabhängig von kurzfristigen Blutdruckschwankungen und Perfusionsunregelmäßigkeiten im Nierenparenchym eine kontinuierliche Funktion der Niere sicherstellt [Übersicht in Schnermann 1998]. Die zweite Funktion des JGA ist die Regulation von Reninsynthese und Reninsekretion durch granulierte, glattmuskuläre Mediazellen im Bereich der afferenten Arteriole [Taugner et al. 1984]. Gesteuert wird auch dieser Regulationsmechanismus durch veränderte Salzkonzentrationen am MD-Segment des TAL. Geringe Salzkonzentrationen stimulieren die Reninsynthese und Sekretion. Hierbei wird nicht nur die Reninsynthese in den vorhandenen granulierten Zellen gesteigert, sondern es kommt zusätzlich noch zu einer reversiblen, metaplastischen Transformation von glattmuskulären Zellen der afferenten Arteriole in granuliert Zellen [Barajas 1979, 1997]. Hohe Salzkonzentrationen an der Macula densa führen umgekehrt zur Abnahme sowohl von lokal nachweisbarer Renin mRNA und von Renin-Protein als auch konsequenterweise zur Abnahme der Plasmareninaktivität (PRA). Die Regulation der Reninsynthese und der resultierenden Plasmareninspiegel, abhängig vom Salzgehalt an der MD, erfolgt erheblich langsamer als die Regulation des schnellen TGF. So findet sich bei Blockierung des distalen Salztransportes durch Furosemid erst nach 4 Stunden ein Anstieg der Renin mRNA-Spiegel in granulierten Muskelzellen [Chen et al. 1993]. Auch der Effekt einer verringerten Reninsynthese und Sekretion kommt erst mit Latenz zum Tragen, da der vorhandene Plasmareninpool als Puffer fungiert. Im Gegensatz zum TGF kommt es aber auch bei langfristigen Veränderungen der Salzkonzentration am distalen Nephron nicht zu einem Resetting des Mechanismus. So konnte gezeigt werden, dass Menschen, die sich sehr salzarm ernähren, lebenslang erhöhte Syntheseraten für Renin und erhöhte Plasmareninspiegel aufwiesen [Oliver et al. 1981]. Sinn dieser Regulation ist ein Erhalt von Salzhomöostase und Blutdruck auch bei dauerhaft veränderten Plasmasalzkonzentrationen und dauerhaft verändertem Perfusionsdruck der Niere aufgrund lokaler und systemischer Alterationen.

## 1.4.2 NO-Synthase im JGA

### 1.4.2.1 Morphologie

MD-Zellen exprimieren im Gegensatz zu umgebenden TAL-Zellen NO-Synthase 1 (NOS1) [Mundel et al. 1992, Wilcox et al. 1992]. Ausgehend von diesen ersten Befunden konnte das Vorhandensein von NOS1-Proteins in MD-Zellen durch Immunfluoreszenz, von NOS1-mRNA durch In situ-Hybridisierung und reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) und von Enzymaktivität durch die Nikotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat (NADPH)-Diaphorasereaktion nachgewiesen werden [Bachmann und Mundel 1994, Tojo et al. 1994, Bachmann et al. 1995, Singh et al. 1996]. Ausgehend von dieser morphologischen Besonderheit stellte sich die Frage, welche Funktion im Rahmen der JGA-Regulationsmechanismen der NOS1 zukommt.

#### 1.4.2.2 NO und TGF

Bis heute ist nicht bis in alle Einzelheiten geklärt, welche intrazellulären und interzellulären Mechanismen am JGA für die Funktion des TGF verantwortlich sind. Eine zentrale Rolle bei der Signalübermittlung scheint das Adenosin einzunehmen [zur Übersicht: Schnermann 1998]. Hinzu kommen aber noch eine Reihe weiterer möglicher Modulatoren mit regulierendem Einfluß auf die TGF-Funktion. Zu diesen gehört nach heutigem Wissensstand auch das NO. So konnte gezeigt werden, dass es durch Zugabe von unspezifischen NO-Synthaseblockern zur luminalen Flüssigkeit sowohl in vivo als auch in vitro zu einer verstärkten TGF-Antwort auf veränderte Salzkonzentrationen kam [Ito und Ren 1993, Thorup und Persson 1994, Braam und Koomans 1995]. Bestätigt wurden diese Befunde durch ähnliche Ergebnisse mit selektiveren NOS1-Inhibitoren [Thorup et al. 1996, Welch und Wilcox 1997, Ichihara et al. 1998]. Durch Blockierung des Salztransports an der MD durch Furosemid ließ sich dieser verstärkende Effekt der NOS-Blockade auf die TGF-Ansprechbarkeit vollständig unterdrücken [Wilcox et al. 1992]. Aus den oben erwähnten Studien geht hervor, dass NO als Modulator fungiert, der in der Lage ist, die TGF-Antwort der afferenten Arteriole auf veränderte luminalen Salzkonzentrationen abzupuffern und der zu einem Resetting des TGF-Mechanismus auf höhere mittlere Perfusionsdrücke am Glomerulum führen kann [hervorragende Übersichten in Wilcox 1998 und Welch et al. 1999].

#### 1.4.2.3 NO und Reninsekretion

##### 1.4.2.3.1 In vivo

Die Frage des Einflusses von NO auf das Renin-Angiotensinsystem war und ist Gegenstand intensivster Forschungsbemühungen. Die bisher vorliegende Flut von Ergebnissen ist im Detail noch sehr widersprüchlich. In vivo konnte sowohl bei verschiedenen Rattenstämmen, bei Kaninchen und Hunden, aber auch beim Menschen durch kurzzeitige Gabe von NO-Synthaseblockern ein Abfall der Plasmapreninaktivität nachgewiesen werden [Persson et al. 1993, Goyer et al. 1994, Johnson und Freeman 1994, Navarro et al. 1994, Knoblich et al. 1996, Haynes et al. 1997]. Chronische Behandlung mit unselektiven NO-Synthaseblockern (z.B. L-NAME) führten in anderen Studien zu einem Anstieg der PRA [Ribeiro et al. 1992, Zanchi et al. 1995]. Allerdings sei angemerkt, dass viele Autoren diesen Effekt eher auf die durch chronische NO-Blockade hervorgerufene, hypertensive Nierenschädigung als auf eine direkte NO-Blockade zurückführen [Yamada et al. 1996]. Des weiteren problematisch bleibt bei unselektiver NO-Synthaseblockierung in vivo die Unmöglichkeit zu unterscheiden, ob die beobachteten Änderungen der PRA auf die Blockade der MD-NOS (NOS1) oder der ebenfalls am JGA reichlich vorhandenen endothelialen NO-Synthase (NOS3) zurückzuführen sind. Deutlicher wurde der Effekt einer NO-Blockade auf die PRA durch Versuche an Ratten und Hunden mit aktiviertem RAS, erzeugt beispielsweise durch salzarme Diät, durch verminderten renalen Perfusionsdruck oder durch Behandlung mit ACE-Hemmern. Hier zeigte sich, dass eine NOS-Blockade in der Lage ist die im Normalfall eintretende Stimulierung des RAS signifikant zu vermindern [Naess et al. 1993, Persson et al. 1993, Deng et al. 1994, Knoblich et al. 1996, Beierwaltes 1997, Manning et al. 1997]. Interesse weckte vor allem der Befund an Ratten und Menschen, dass auch die Stimulierung des RAS durch Furosemid durch NO-Blockade verhindert werden kann [Schricker et al. 1995, Lee et al. 1999], da dieser Effekt relativ eindeutig auf die Blockierung der MD-NOS zurückgeführt werden kann. Belegt wird diese Hypothese durch ähnliche Ergebnisse mit dem relativ selektiven NOS1-Inhibitor 7-Nitroindazol [Beierwaltes 1995, 1997]. Des weiteren zeigte sich, dass sich durch NOS-Blockade die renalen Renin-mRNA-Spiegel und der Reningehalt der Nieren von Ratten vermindern ließen [Schricker et al. 1994, Tharaux et al. 1997], bzw. dass bei Tieren, die unter RAS-stimulierenden Konditionen mit zusätzlicher NO-Blockade gehalten wurden, der erwartete Anstieg von Renin-mRNA und Proteingehalt ausblieb [Schricker et al. 1994, 1996, Tharaux et al. 1997]. Bei Mäusen mit Nullmutationen für NOS1, aber auch bei Mäusen mit Nullmutationen für NOS3 wurden verminderte renale Renin-mRNA und Proteinlevel beschrieben [Shesely et al. 1996, Wagner et al. 2000]. Schwierig ist in diesem Zusammenhang die Unterscheidung zwischen direktem und indirektem Effekt einer NOS-Blockade auf das RAS. So führt beispielsweise ein Hypertonus (wie er bei NOS-Blockade vorliegt) per se zu einer Herunterregulierung des RAS. Allerdings zeigten Studien an Tieren

mit NOS-Blockade, deren renaler Perfusionsdruck durch maschinelle Kontrolle konstant gehalten wurde, mit den oben geschilderten Resultaten vergleichbare Ergebnisse [Johnson und Freeman 1994]. Auch ließ sich keine klare Korrelation zwischen den durch NO-Blockade erhöhten Blutdruckwerten und dem Aktivierungsgrad des RAS herstellen [Schricker et al. 1996].

#### 1.4.2.3.2 In vitro

Die bei in vivo Experimenten gewonnenen Erkenntnisse werden ergänzt durch eine Vielzahl von in vitro Studien an isoliert perfundierten Nieren, isolierten JGA-Präparationen und Zellkulturen. So zeigte sich, dass an isoliert perfundierten Nieren die Zugabe eines NO-Donors zum Perfusat zu einer sofortigen dosisabhängigen Stimulation der Reninsekretion führte [Scholz und Kurtz 1993, Kurtz et al. 1998], wobei der Grad der Stimulation vom Perfusionsdruck abhing. In gleicher Weise wie bei in vivo Studien zeigte sich an isoliert perfundierten Nieren mit NO-Blockade eine verminderte Reninausschüttung [Gardes et al. 1992, Hackenthal et al. 1994]. Weniger klar sind die Ergebnisse an Zellkulturen, Nierenschnitten und isolierten afferenten Arteriolen. Einige Autoren berichten über inhibitorische Effekte von NO auf die Reninsekretion an Nierenschnitten und über stimulierte Reninsekretion unter NOS-Blockade [Henrich et al. 1988, Beierwaltes und Carretero 1992]. Die Untersuchungen an isolierten JGA-Präparationen mit intakter Macula densa wiederum zeigten zweierlei Effekt. Zum einen führt eine NOS-Blockade via Mikroperfusion des MD-Segments zu einer Inhibition und eine Zugabe von L-Arginin, dem Hauptsubstrat der NO-Synthase, zu einer Stimulation der Reninsekretion, zum anderen allerdings zeigte sich bei Zugabe von L-Arginin direkt an die afferente Arteriole eine Inhibition der Reninsekretion [He et al. 1995]. Diese Beobachtung legte den Rückschluß nahe, dass das im Endothel durch NOS3 gebildete und das von der MD-NOS1 synthetisierte NO unterschiedliche Effekte auf die Reninsekretion ausüben könnte. Eine Reihe von Experimenten an kultivierten Renin-synthetisierenden, granulierten Zellen ergaben keine eindeutigen Ergebnisse betreffs Stimulation vs. Inhibition des RAS durch NO [Kurtz et al. 1991, Schricker und Kurtz 1993, Greenberg et al. 1995].

#### 1.4.2.3.3 Parallele Regulation von NOS1 und Renin

Weitere Hinweise zum Zusammenhang zwischen NO-Formation am JGA und Aktivierung des RAS ergaben sich aus Versuchsansätzen, die die MD-NOS Genexpression und Proteinkonzentration mit Renin m-RNA und Proteinkonzentration in der afferenten Arteriole in verschiedenen Tiermodellen verglichen. So führte eine über einen längeren Zeitraum durchgeführte Behandlung mit NOS-Blockern bei Ratten zu einer Abnahme von MD-NOS1 Protein- und Genexpression bei gleichzeitiger Verminderung der Renin mRNA und Proteinlevel [Bosse et al. 1995]. Eine parallele Erhöhung aller Parameter ließ sich im Bereich des JGA von Nieren mit Nierenarterienstenose nachweisen, wobei die jeweils nichtstenotische kontralaterale Niere eine gleichsinnige Verminderung aller NOS1 und Reninparameter aufwies [Bosse et al. 1995, Schricker et al. 1995]. Vergleichbare Ergebnisse erbrachten Versuche an Tieren unter salzarmen/salzreicher Diät. Auch hier zeigte sich eine parallele Erniedrigung (salzreich) oder Erhöhung (salzarm) von NOS1 m-RNA/Protein und Renin mRNA/Protein [Bosse et al. 1995, Schricker et al. 1996]. Passend hierzu fanden Nishimura und Koautoren [1997] eine erhöhte Nitratkonzentration im Urin von Ratten, die mit einer salzarmen Diät behandelt wurden.

#### 1.4.2.3.4 Signaltransduktion

Die Frage, wie die Freisetzung von NO schließlich zu einer Induktion bzw. Hemmung des RAS führt, ist noch nicht abschließend beantwortet. Gesichert ist, dass NO als potenter Stimulator der löslichen Guanylatzyklase (sGC) fungiert und so in der Lage ist, die intrazellulären Konzentrationen von cGMP zu erhöhen [Ignarro 1989, Moncada et al. 1991, Schmidt et al. 1993]. Außerdem wurde beobachtet, dass Inhibitoren der sGC sowohl die stimulierende als auch die inhibitorische Wirkung von NO auf das RAS blockieren [Ignarro 1989, Noble et al. 1994], was den Rückschluß zuließ, dass die Bildung von cGMP für die Wirkung von NO am JGA entscheidende Bedeutung hat. sGC ließ sich sowohl in den juxtaglomerulären granulierten Zellen als auch im extraglomerulären und intraglomerulären



Mesangium nachweisen [Bachmann et al. 2000]. Der Zusammenhang zwischen erhöhten cGMP-Spiegeln und einer Aktivierung bzw. Inhibierung des RAS ist unklar und soll hier nur zusammenfassend kurz beschrieben werden [ausführlich diskutiert in Kurtz und Wagner 1998]. Der Effekt von cGMP-Analoga in in vitro Experimenten auf die Ausschüttung von Renin war abhängig von der Art der verwendeten Substanz, von der Konzentration und von der Dauer der Behandlung und reichte von inhibitorischer [Kurtz et al. 1986, Henrich et al. 1988, Kurtz et al. 1998, Ichihara et al. 1998] bis zu stimulatorischer [Takagi et al. 1988, Noble et al. 1994] Beeinflussung. Diese Beobachtungen legten nahe, dass es zumindest zwei mögliche Koppelungen von RAS und cGMP geben mußte. Es sei bemerkt, dass der Hauptaktivator für die Stimulation von Reninsynthese und Sekretion nach heutigem Kenntnisstand die Höhe des intrazellulären cAMP-Spiegels darstellt [Della Bruna et al. 1995, 1996]. Als Möglichkeit für eine inhibitorische Kontrollfunktion wurde die durch cGMP vermittelte Aktivierung von spezifischen cAMP-Phosphodiesterasen (vor allem cAMP-PDE2), die zu einer Absenkung der intrazellulären cAMP-Spiegel und damit zu einer Verminderung von Reninsynthese und Sekretion führt, postuliert. Weiterhin denkbar ist eine durch cGMP vermittelte Aktivierung von Proteinkinasen (G-Kinasen). Diese Hypothese wurde gestützt durch die Beobachtung, dass an isolierten, mit G-Kinase-Inhibitoren perfundierten Nieren eine Stimulation des RAS eintritt [Kurtz et al. 1998]. Wie eine Aktivierung von G-Kinasen zu einer Hemmung des RAS führt, blieb unklar. Auch für die stimulatorische Wirkung von cGMP auf das RAS gibt es mehrere denkbare Übermittlungswege. So gibt es neben durch cGMP aktivierbaren cAMP-PDEs auch durch cGMP inhibierbare cAMP-PDEs, vor allem cAMP-PDE3 [Beavo 1995]. Diese Theorie ist insofern attraktiv, als zum einen gezeigt werden konnte, dass PDE3 reichlich in renalen Gefäßen und vor allem in der afferenten Arteriole nachweisbar ist [Reinhardt et al. 1995, Kurtz und Wagner 1998] und dass zum anderen eine Hemmung von PDE3 zu einem Komplettausfall des stimulatorischen Effektes von NO auf das RAS führt [Chiu und Reid 1996]. Als weitere mögliche Signaltransduktionswege wurden die Aktivierung von A-Kinasen oder eine Reduktion des zytosolischen Kalziums der granulierten Zellen durch erhöhte cGMP-Spiegel postuliert. Die Folge wäre ebenfalls eine Aktivierung des RAS [Forte et al. 1992, Chao et al. 1994, Schnackenberg et al. 1997]. Es bleibt aber zu vermuten, dass die tatsächliche Signaltransduktion noch erheblich komplizierter ist als bisher angenommen und dass weitere, bisher nicht bekannte Mediatoren ebenfalls eine entscheidende Rolle spielen. Ein neuerer Denkansatz in Bezug auf die Signaltransduktion geht von einer NO/Prostaglandin-Interaktion aus. Hierzu sei auf den Absatz *NO und Prostaglandine* verwiesen.

### 1.4.3 Prostaglandine im JGA

#### 1.4.3.1 Morphologie

Harris und Mitarbeitern [1994] gelang erstmals der Nachweis von Cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA im Bereich des TAL in Tubulusepithelien, die in unmittelbarer Nachbarschaft zur Macula densa lagen. MD-Zellen selbst exprimierten ebenfalls COX-2 mRNA, allerdings in unstimuliertem Zustand auf einem niedrigeren Level. Die COX-2 gilt als induzierbare Isoform, die vor allem im Entzündungsgeschehen eine entscheidende Rolle spielt. Die Bildung von Prostaglandin G/H<sub>2</sub> aus Arachidonsäure durch die Cyclooxygenase gilt als geschwindigkeitsbestimmender Schritt bei der Prostaglandinsynthese. Diese Befunde wurden mittels RT-PCR in der Ratte und mittels In situ-Hybridisierung im Kaninchen bestätigt [Guan et al. 1997, Schnermann 1998]. Auch auf der Proteinebene ließ sich COX-2 im TAL/MD-Bereich nachweisen (eigene Ergebnisse). Im Gegensatz zur COX-2 ließ sich die Cyclooxygenase 1 (COX-1) lediglich im Mesangium des Glomerulum, nicht aber im Bereich des JGA nachweisen [Yang et al. 1998]. Zur Frage der Expression von Prostaglandinrezeptoren im Bereich des JGA gibt es zur Zeit erst wenige Erkenntnisse. Die mRNA des Prostaglandin E<sub>2</sub> Rezeptor vom EP<sub>4</sub>-Subtyp konnte im Bereich des Glomerulum nachgewiesen werden [Breyer et al 1993, 1996], außerdem fand sich EP<sub>3</sub>-mRNA in MD-Zellen [Sugimoto et al. 1992]. Ebenfalls im Glomerulum konnten Thromboxanrezeptor- und Thromboxansynthase-mRNA nachgewiesen werden [Abe et al 1995]. Weiterführende Informationen finden sich in einer Übersicht zum Thema von Breyer und Breyer [2000].

#### 1.4.3.2 Prostaglandine und TGF

Die Beobachtung, dass ähnlich der NOS1 bei der COX-2 ebenfalls eine Regulation durch unterschiedliche Salzkonzentrationen an der MD stattfand [Harris et al. 1994], führte zu der Vermutung, dass die synthetisierten Prostaglandine eine Rolle bei der Regulation von TGF und/oder Reninsekretion spielen könnten. Tatsächlich zeigte sich, dass sich die vasokonstriktorische TGF-Komponente durch unspezifische COX-Blocker aufheben ließ [Schnermann et al. 1979]. Dieser Effekt wurde der Hemmwirkung auf die Thromboxanbildung zugesprochen. Wegen der hierzu nötigen hohen Dosen des Inhibitors und multipler möglicher Nebeneffekte der Behandlung ist die Aussagekraft dieses Versuchsansatzes allerdings begrenzt. Neuere Ergebnisse von Ichihara und Koautoren [1998, 1999] mit dem spezifischen COX-2-Inhibitor NS398 wiesen in eine andere Richtung. Unter Ruhekonditionen änderte sich der Durchmesser der afferenten Arteriole nach Zugabe von NS398 nicht. Wurde nun aber die Salzbelastung des distalen Tubulus entweder durch Erhöhung des Perfusionsdrucks oder durch Gabe von Acetazolamin erhöht, verstärkte die COX-2-Blockade die auftretende Vasokonstriktion der afferenten Arteriole signifikant. Durch Blockierung des MD-Salztransports durch Furosemid oder durch Papillektomie konnte dieser Effekt verhindert werden. Diese Ergebnisse wiesen ähnlich der NOS1-Wirkung auch für COX-2 auf eine modulierende Beteiligung des TGF im Sinne einer Attenuierung der TGF-Antwort auf verschiedene Salzkonzentrationen hin. Für mögliche Zusammenhänge zwischen NO und Prostaglandinen bei der Modulation des TGF sei auf den Absatz *NO und Prostaglandine* verwiesen.

#### 1.4.3.3 Prostaglandine und Renin

Die Beobachtung, dass unter Salzrestriktion, unter Behandlung mit ACE-Hemmern und AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten und bei Mäusen mit Nullmutationen für den AT<sub>1</sub>-Rezeptor jeweils eine erhöhte Expression von MD und peri-MD COX-2-mRNA und Protein vorlag [Harris et al. 1994, Jensen und Kurtz 1997, Yang et al. 1998, Harris et al. 2000], legte, da es sich jeweils um Zustände mit bekanntermaßen aktiviertem RAS handelte, den Rückschluß nahe, dass zwischen der Regulation von Prostaglandinen an der MD und dem RAS ein Zusammenhang bestehen könnte. Für die zweite COX Isoform, die COX-1, konnte in Hemmversuchen keine Regulierung nachgewiesen werden [Traynor et al. 1999]. Passend zu diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass Prostaglandine, vor allem Prostaglandin E<sub>2</sub> und Prostaglandin I<sub>2</sub>, in der Lage sind die Reninsekretion zu stimulieren [Larsson et al. 1974, Gerber et al. 1981, Jensen et al. 1996], eventuell über die Prostaglandin E<sub>2</sub>-Rezeptoren EP<sub>2</sub> und EP<sub>4</sub>, deren Aktivierung zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel führt [weiterführende Informationen in Breyer und Breyer 2000]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass MD COX-2-mRNA und Proteinspiegel unter negativer Kontrolle des Plasmaangiotensin II-Spiegels stehen [Cheng et al. 1999], was einem negativen Feedbackloop entspricht. Vermittelt wurde dieser Effekt über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor. Bestätigt wurden diese Erkenntnisse durch Versuche mit COX-Hemmern. So führte die Behandlung mit unspezifischen COX-Inhibitoren zu einem Komplettausfall der RAS-Aktivierung bei Tieren mit Salzrestriktion [Greenberg et al. 1993]. Nachfolgende Versuche zeigten, dass sich die RAS-Aktivierung bei Tieren, die mit ACE-Hemmern oder Salzrestriktion behandelt wurden, auch durch Administration eines selektiven COX-2-Inhibitors vollständig verhindern ließ [Harding et al. 1997, Wang et al. 1999, Traynor et al. 1999, Harris et al. 2000].

#### 1.4.3.4 Interaktion von Prostaglandinen und NO am JGA

Die räumliche Nähe der Expression von COX-2 und NOS1 im Bereich der MD und ihre bei einigen Versuchsbedingungen gleichgerichtete Regulierung führte zu der Vermutung, dass zwischen beiden Enzymen ein funktioneller Zusammenhang bestehen könnte. Die COX-2 ist ein Enzym mit Heme-Domäne und benötigt für ihre Aktivierung Hydroperoxide [Smith und Marnett 1991]. NO wiederum ist ein Radikal, das mit Proteinen mit Heme-Domäne interagiert [Ignarro 1990]. Damit liegt die Möglichkeit einer Einflußnahme von in der MD gebildetem NO auf die MD- und peri-MD-COX-2 nahe. In

Zellkulturen konnte des weiteren nachgewiesen werden, dass NO in der Lage ist in einer Reihe von unterschiedlichen Geweben die Prostaglandinproduktion zu stimulieren [Salvemini et al. 1994, 1995, Tetsuka et al. 1996], wenngleich auch gegensinnige Regulation in einigen Geweben beschrieben wurde [Habib et al. 1997]. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass NO in vitro via Formation von Peroxinitriden COX-2 und ebenso COX-1 aktiviert [Landino et al. 1996]. In Zellkulturen von cTAL-Zellen ließ sich die Expression von COX-2 sowohl durch Zugabe von NO-Donoren als auch durch Zugabe von cGMP signifikant erhöhen, umgekehrt kam es durch Gabe von selektiven NOS1 und unselektiven NOS-Inhibitoren zu einem Abfall der COX-2-Expression [Cheng et al. 2000], was neben dem Peroxinitrit-Aktivierungsweg der COX-2 auch auf eine cGMP vermittelte Wirkung von NO auf die COX-2-Expression deutet. Wie diese Wirkung im einzelnen vermittelt wird, ist unbekannt. Des weiteren ließ sich an JGA Präparationen nachweisen, dass die TGF-Antwort auf einen erhöhten Perfusionsdruck, die jeweils durch NOS1- und COX-2-Inhibition verstärkt wird (siehe oben), sich nach Blockade von COX-2 durch zusätzliche Blockade von NOS1 nicht noch weiter verstärken ließ [Ichihara et al. 1999]. Hieraus schlossen die Autoren, dass COX-2 möglicherweise in der Signaltransduktion von MD-Salzgehalt/NO-Formation und Modulation des Durchmessers der afferenten Arteriole als Signalmittler fungiert. Zusätzlich fanden dieselben Autoren, dass bei COX-2-Blockade und Salzbeladung des distalen Nephrons sich durch Vorbehandlung mit selektiven NOS1-Inhibitoren eine über die NOS1-Inhibition hinausgehende verstärkte Konstriktion der afferenten Arteriole verhindern ließ [Ichihara et al. 1998]. Hinweise gibt es auch auf ein Zusammenwirken von NOS1 und COX-2 bei der Regulation des RAS. So ließ sich bei Ratten unter Salzrestriktion und unter Behandlung mit einem ACE-Hemmer, beides Zustände mit aktiviertem RAS, der zu erwartende Anstieg von COX-2-mRNA und Protein durch die Behandlung mit selektiven NOS1-Inhibitoren vollständig verhindern [Cheng et al. 2000, Harris et al. 2000].

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die histomorphologischen Schäden, die sich bei den FHH-Ratten unterschiedlichen Alters entwickeln, qualitativ und quantitativ zu bewerten. Hierbei sollten vor allem die glomerulären Schädigungen unterschiedlichen Ausmaßes präzise dokumentiert werden. Zusätzlich sollte die Frage geklärt werden, ob ähnlich der humanen FSGS auch bei der FSGS der FHH-Ratte Verschiebungen in der Expression und Einlagerung von Kollagenen am Glomerulum und im Tubulussystem zu beobachten sind. Des weiteren sollte das renale Gefäßsystem der FHH-Ratten unterschiedlichen Alters einer genauen histomorphologischen Untersuchung unterzogen werden, da Veränderungen der vaskulären Architektur möglicherweise an der Entstehung der FSGS bei der FHH-Ratte mitwirken.

Das zweite zentrale Anliegen dieser Arbeit war, den JGA der FHH-Ratte einer genaueren Analyse zu unterziehen, mit Hinblick auf die Frage, ob sich Hinweise zur Entstehung des glomerulären und systemischen Hypertonus der FHH-Ratten und damit zur Pathogenese der FSGS ergeben. Hierzu sollten die Expressionsmuster zweier in der Regulation der JGA-Funktion wichtiger Enzymsysteme, der NOS1 und der COX-2, untersucht werden. Weiterhin sollten die Ergebnisse in Zusammenhang gebracht werden mit der ebenfalls untersuchten Expression von Renin am JGA und der Expression des wichtigsten Salztransporters an der MD, des NKCC2. Zu diesem Zweck wurden zum einen 8 Wochen junge FHH-Ratten verwendet, da man davon ausgehen konnte, dass in diesem Alter noch keine massive renale Schädigung vorliegt, zum anderen wurden 16 Wochen alte FHH-Ratten verwendet, bei denen das Vorhandensein einer FSGS bereits gezeigt werden konnte. Als Kontrollen dienten FHL-Ratten, da diese genetisch mit der FHH-Ratte verwandt sind, sie aber keinen glomerulären Hypertonus und keine FSGS entwickeln.

Anschließend sollte die Frage beantwortet werden, ob mögliche Veränderungen in der JGA-Signalkaskade zeitlich gesehen vor und/oder nach Schädigungszeichen an der Niere vorliegen und ob ein Zusammenhang bestehen könnte. Diskutiert werden sollte außerdem die Frage, ob sich aus den Ergebnissen mögliche Hinweise ergeben, die eine Beteiligung des JGA bei der Entstehung der menschlichen FSGS vermuten lassen würden.

Daneben stellte sich die Frage, ob sich weitere Erkenntnisse zu möglichen Interaktionen von NOS1, COX-2 und Renin an der MD gewinnen lassen würden, um einen weiteren kleinen Mosaikstein zum Verständnis der JGA-Funktion hinzufügen zu können.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Versuchstiere

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden durchgeführt mit 8 Wochen und 16 Wochen alten, hypertensiven „fawn-hooded“ Ratten (FHH8; n=4, FHH16; n=5) und 16 Wochen alten „fawn-hooded“ Ratten mit nahezu normalem Blutdruck (FHL16; n=4). Das Züchten der Ratten erfolgte in den Versuchstiereinrichtungen der Erasmus Universität Rotterdam, Niederlande, sie wurden uns im Rahmen einer Forschungsk Kooperation von Prof. Dr. A. P. Provoost zur Verfügung gestellt. Die Versorgung und Fütterung der Tiere erfolgte nach Standardbedingungen, mit Trinkwasser *ad libitum*. Da die üblichen klinischen Parameter bei Nierenschädigung (glomeruläre Filtrationsrate, Art und Menge der Proteinurie, Blutdruck, renaler Plasmafluss, u.v.a.) durch vorhergehende Studien [Simons et al. 1993, van Dokkum et al. 1997, van Dokkum et al. 1998] an gleich gehaltenen und gleich alten Tieren ausreichend dokumentiert sind, beschränkten wir uns auf das Messen des systolischen Blutdruckes durch indirekte Schwanzplethysmografie an bewußtseinsklaren Tieren und Messung der Proteinexkretion im Urin in metabolischen Käfigen über 24 Stunden. Die Proteinkonzentration wurde colorimetrisch durch Präzipitation mit 3% Sulfosalizylsäure bestimmt. Alle Messungen wurden kurz vor der Perfusionsfixierung durchgeführt.

### 3.2 Perfusionsfixierung und Gewebprozessierung

Zunächst wurden die Tiere mit Äther narkotisiert. Die Anästhesie erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 40 mg/kg Körpergewicht Nembutal (Sanofi-CEVA, Bad Segeberg). Anschließend wurde der Bauchraum der Tiere eröffnet. Nach Anschlingen der Aorta wurde diese distal des Abganges der Arteriae renales eröffnet und über einen nach proximal gerichteten Polyethylenschlauch mit dem Perfusionssystem verbunden. Zum Druckausgleich erfolgte die Eröffnung der unteren Vena Cava. Nach Vorspülen mit einer 21° warmen Sucrose/PBS-Lösung (330 mosmol, pH 7,35) für 30 Sekunden mit 220 mmHg erfolgte die Perfusion mit frisch präpariertem, 3 prozentigen Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt) in PBS (pH 7,35, 21°) mit initial 220 mmHg (90 Sekunden) und anschließend 60 mmHg für 3,5 Minuten. Um die Nieren vor Gefrierartefakten zu bewahren, wurde nach Abklemmen und Entnahme der rechten Niere zur Paraffin/Eponeinbettung abschließend eine Perfusion mit einer Sucrose/PBS-Lösung (800 mosmol, pH 7,35, 21°) für 5 Minuten durchgeführt. Anschließend wurde die linke Niere entnommen und sofort in flüssigem Isopentan schockgefroren. Von der vorher entnommenen rechten Niere wurde jeweils ein kleiner Gewebsblock zur Eponeinbettung abgetrennt. Der Rest wurde im Rahmen der Paraffineinbettung für 4 Stunden bei 4° in einer Immersionslösung, die in ihrer Zusammensetzung der Perfusionslösung entsprach, belassen. Dann folgten 3 Waschschr itte für jeweils 1 Stunde in PBS und die Entwässerung bei 4° in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50%, 2x75%, 90%, 2x96%, 3x100% für jeweils 1 Stunde). Nun wurden die Gewebe über Nacht bei 40° in Zedernholzöl eingelegt. Das Zedernholzöl wurde anschließend noch 2x gewechselt (jeweils 1 Stunde). Dann folgte die Behandlung der Gewebe für 3x2 Stunden in Paraffin bei 58°, um sie anschließend in Kapseln zu überführen und diese mit Paraffin auszugießen. Zur Abkühlung wurden die eingebetteten Gewebe nun in Eiswasser 20 Minuten gekühlt. Zur Prozessierung der kleinen Gewebsblöcke für die Elektronenmikroskopie wurden diese bei 4° über Nacht in einer Immersionslösung, bestehend aus 1,5% Glutaraldehyd (Merck, Darmstadt) und 1,5% Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4), nachfixiert. Anschließend erfolgte die Entwässerung in einer Ethanolreihe mit aufsteigender Konzentration (50%, 70%, 90%, 96% für je 15 Minuten, 3x100% für je 20 Minuten) und danach die Behandlung in einer 1:1 Lösung aus Propylenoxid und Epon (Fluka, Buchs, Schweiz) über Nacht. Anschließend wurde das Gewebe in Beem-Kapseln (Roth, Karlsruhe) gegeben und mit Epon ausgegossen. Die Aushärtung erfolgte bei 60° in 3 Tagen.

### 3.3 Morphologische Analyse

#### 3.3.1 Anfertigung der Gewebsschnitte

Zum Studium der Histopathologie und des Ausmaßes der glomerulären Schädigung wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte auf einem Rotationsmikrotom (Leica, Heidelberg) angefertigt, in einer absteigenden Ethanolreihe (Xylol 2x10 Minuten, 2x100%, 2x96%, 80%, 70% Ethanol für jeweils 5 Minuten) vorbereitet und in Aqua dest. überführt. Zur Anfertigung einer PAS-Färbung erfolgte die Inkubation in 0,5% Perjodsäure für 10 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte für 10 Minuten unter fließendem Wasser gespült und für 20 Minuten in Schiffssches Reagenz gegeben. Danach wurden die Schnitte für 3x2 Minuten in Sulfittwasser verbracht und erneut fließend gewässert. Nun erfolgte die Inkubation mit Hämalaun nach Mayer (1:5 verdünnt) für 3 Minuten und eine erneute Wässerung. Dann wurden die Schnitte unter Verwendung von Eukitt (Riedel-de-Haën, Seelze) eingedeckelt. Aus dem in Epon eingebetteten Gewebe wurden auf einem Ultramikrotom (LKB, Ultratom 8800) Semidünnschnitte (1 µm) angefertigt, auf alkoholgereinigte Objektträger verbracht, mit Methylenblau-Azur (nach Richardson) gefärbt und unter Verwendung von Eukitt eingedeckelt. Die Beurteilung der Schnitte und die Anfertigung der Photos erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops der Firma Leica (Leica DMRB mit HBO Fluoreszenzlampe). Der größte Teil der Photos wurde mit Hilfe einer an das Mikroskop angeschlossenen herkömmlichen Leica-Kamera angefertigt, die restlichen Photos entstanden mit Hilfe einer digitalen Kamera (Spot32, Diagnostic Instruments, USA) aufgenommen und mit der Software Metaview 4.1 (Universal Imaging Corporation, West Chester, USA) verarbeitet. Die Herstellung von Ultradünnschnitten (60 nm) für die elektronenmikroskopische Beurteilung erfolgte mit einem Ultracut-Mikrotom (Reichert-Jung/Leica). Zur exakten Lokalisation der glomerulären Schädigungen wurden von den entsprechenden Gewebeblöcken zunächst so lange Semidünnschnitte angefertigt, bis sich auf diesen für die elektronenmikroskopische Beurteilung interessante Strukturen identifizieren ließen. Anschließend folgte die Anfertigung der Ultradünnschnitte und das Verbringen derselben auf mit Formvar (Sigma, St.Louis, USA) beschichtete Schlitznetze (Plano, Marburg). Dann wurden die Schnitte 15 Minuten in 5% Uranylacetat inkubiert und für 2 Minuten mit Bleicitrat (Merck) nachkontrastiert. Die Beurteilung erfolgte an einem Zeiss-Elektronenmikroskop (EM 900).

#### 3.3.2 Histopathologische Beurteilung

Die grundsätzliche morphologische Beurteilung erfolgte unter Bewertung der PAS-gefärbten Paraffinschnitte, der Semidünnschnitte und unter Berücksichtigung der Ultrastruktur im Elektronenmikroskop. Zur Quantifizierung der glomerulären Schädigungen erfolgte die Auswertung von 400-600 Glomerula pro Tier an PAS-Schnitten. Glomerula, die ausgeprägte Veränderungen im Sinne einer segmentalen oder globalen Sklerose zeigten (Anheftung von Glomerulumschlingen an die Bowman-Kapsel mit ausgeprägter Ballonierung der Kapillaren, ausgeprägte podozytäre Schädigungszeichen, ausgeprägte segmentale oder globale Einlagerungen von PAS-positivem Material), wurden als positiv bewertet. Nicht als positiv bewertet wurden Veränderungen im Sinne einer dezenten diffusen, vor allem mesangial betonten Sklerosierung. Die Prozentwerte der geschädigten Glomerula mit Bezug auf die Gesamtzahl der Glomerula wurden als Skleroseindex beschrieben. Dieses orientierende Bewertungsverfahren zur Erstellung eines Sklerosescores wurde in einer Reihe vergleichbarer Studien in dieser Form ebenfalls genutzt.

### 3.4 Histochemische Analyse

#### 3.4.1 Diaphorase-Reaktion

Zur Demonstration der Gewebsaktivität der NO-Synthase wurde die Diaphorasereaktion durchgeführt. Hierbei wird Nitro-blue Tetrazolium in Gegenwart von NADPH durch die katalytische Aktivität der NO-Synthase der Macula densa zu einem blauen Farbstoff umgesetzt [vgl. Bachmann et al. 1995]. Zu diesem Zweck wurden am Kryostaten (Kryostat CM3000, Leica) 5 µm dicke Gewebsschnitte (jeweils 2 pro Versuchstier) angefertigt und auf mit Chromgelatine (Kaliumchromsulfat-12-Hydrat, Riedel-de-Haën) beschichtete Objektträger aufgenommen. Anschließend wurden die Gewebsschnitte für 30 Minuten an der Luft getrocknet. Nach Hydrierung der Schnitte für 2x 15 Minuten in einer mit Phosphat gepufferten Salzlösung (Phosphate-buffered Saline (PBS), bestehend aus 8 g NaCl, 240 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,78 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 200 mg KCl in 1000 ml H<sub>2</sub>O; pH 7,4) bei Raumtemperatur, wurden die Schnitte mit Entwicklungspuffer (0,01% Nitro-blue Tetrazolium, 0,3% Triton-X-100, 0,1% β-NADPH (alles Sigma) in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,5) beschichtet und bei 37° inkubiert. Zur Kontrolle wurde bei einem Teil der Schnitte NADH (Boehringer, Ingelheim) anstatt NADPH eingesetzt, was zu einem Ausbleiben der Blaufärbung führte. Die Entwicklung wurde nach 37 Minuten bei Vorliegen eines gut sichtbaren Macula-densa-Signals und relativem Fehlen von Hintergrundfärbung durch Waschen der Schnitte für 2x15 Minuten in PBS bei Raumtemperatur gestoppt. Die Schnitte aller Versuchstiere wurden im gleichen Experiment prozessiert und die Reaktion für alle Schnitte gleichzeitig gestoppt. Die Beurteilung der Schnitte erfolgte mit Hilfe eines Leica DMRB-Mikroskops, die Erstellung der Photos mit einer auf das Mikroskop montierten Leica-Kamera.

#### 3.4.2 Proteinnachweis durch Antikörperdetektion

##### 3.4.2.1 *Primärantikörper*

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper sind bereits eingesetzt und charakterisiert worden. Bei dem zur Detektion von Renin eingesetzten Antikörper handelte es sich um einen im Kaninchen generierten, polyklonalen, gegen aufgereinigtes Renin gerichteten Antikörper, der freundlicherweise von Dr. E. Hackenthal aus Heidelberg zur Verfügung gestellt wurde. Bei dem zur Detektion von Kollagen IV eingesetzten Antikörper handelt es sich um einen polyklonalen, im Kaninchen generierten, gegen α1α2-Kollagen IV der Maus gerichteten Antikörper (Beckton/Dickinson, Bedford, USA). Die Detektion des glattmuskulären α-Aktins erfolgte durch einen monoklonalen, in der Maus generierten, gegen humanes α-smooth-muscle-actin gerichteten Antikörper (Dako, Glostrup, Dänemark). Zur Darstellung des Cyclooxygenase-2-Proteins wurde ein polyklonaler, in der Ziege generierter und gegen das carboxyterminale Ende der COX-2 der Ratte gerichteter Antikörper verwendet (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg).

##### 3.4.2.2 *Detektion der gebundenen Primärantikörper*

###### 3.4.2.2.1 Peroxidase-Anti-Peroxidase-Reaktion

Als Detektionssystem zur Darstellung des gebundenen Renin-Primärantikörpers wurde das Peroxidase-Anti-Peroxidase-System eingesetzt. Hierzu wurden jeweils zwei 5 µm dicke Paraffinschnitte pro Versuchstier auf einem Rotationsmikrotom angefertigt, entsprechend des im Rahmen der PAS-Färbung beschriebenen Procedere in einer absteigenden Ethanolreihe entparaffiniert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur in PBS verbracht. Anschließend erfolgte zum

Blocken unspezifischer Proteinbindungsstellen die Inkubation mit 10% nativem Schweineserum (NSS, Boehringer) in Wasser für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach 2 weiteren Waschschritten in PBS (jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur) wurden die Schnitte zum Blocken der endogenen Peroxidasen für 12 Minuten bei Raumtemperatur mit 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck) in 100% Methanol (J.T.Baker, Griesheim) behandelt. Es folgten 2 weitere Waschschrritte mit PBS für 5 Minuten, bevor der Primärantikörper 1:5000 in PBS mit 1% nativem Schweineserum aufgetragen wurde. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer, die für 2 Stunden auf einem Schüttler bei Raumtemperatur belassen wurde und anschließend über Nacht bei 4° lagerte. Am nächsten Morgen wurden die Schnitte für 3x10 Minuten bei Raumtemperatur in PBS gewaschen und mit einem Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-Serum (Dako; 1:20 in PBS) überschichtet. Nach Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler und 2 Waschschrritten (2x5 Minuten PBS bei Raumtemperatur) erfolgte das Auftragen des PAP-Komplexes (im Kaninchen generierte, mit Peroxidase gekoppelte Anti-Peroxidase-Antikörper (Dako) 1:100 in PBS mit 1%NSS). Nach 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte dreimaliges Waschen (jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur) in PBS und die Entwicklung der Farbreaktion durch Aufbringen von 0,1% Diaminobenzidin (Sigma) und 0,02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS. Die Entwicklung wurde bei ausreichender Ausprägung des Signals in der afferenten Arteriole nach 18-20 Minuten durch Baden der Schnitte in PBS (3x 10 Minuten bei Raumtemperatur) gestoppt und anschließend erfolgte das Eindeckeln unter Verwendung von Eukitt. Bei den Experimenten wurden jeweils 2 Nierenschnitte pro Tier im gleichen Experiment verwertet und die Reaktion wurde an allen Schnitten gleichzeitig gestoppt. Als Kontrolle dienten Schnitte, bei deren Behandlung die Inkubation mit dem Primärantikörper durch Beschichtung mit PBS ersetzt wurde. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung des Interferenzkontrastes an einem Leica DMRB Mikroskop. Die Photos wurden mit einer aufmontierten Leica-Kamera angefertigt.

#### 3.4.2.2.2 Silberverstärkte Goldmarkierung

Zur Detektion des glattmuskulären Aktins wurde die silberverstärkte Goldmarkierung genutzt. Zu diesem Zweck wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt und in der im vorigen Abschnitt beschriebenen Weise entparaffiniert und in PBS verbracht. Zur Verbesserung der Antigenität wurden die Schnitte in einen Puffer, bestehend aus 0,1 M Natriumzitat (Merck) in Wasser (mit einem pH von 6,0), überführt und unter Wechseln des Puffers für 2x10 Minuten bei 600 Watt in einer herkömmlichen Mikrowelle gekocht. Anschließend kühlten die Schnitte bei Raumtemperatur in PBS für 20 Minuten ab. Es folgte die Überschichtung mit 5% Milchpulver (Magermilchpulver, Nestlé, Frankfurt) in Wasser zum Blocken unspezifischer Proteinbindungen und nach Entfernen des Blockingmediums das Aufbringen des α-smooth-muscle-actin-Antikörpers 1:100 verdünnt in PBS mit 1% NSS. Die Gewebsschnitte wurden für 1 Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert und über Nacht bei 4° gelagert. Nach 3 Waschschrritten in PBS zu je 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Schnitte mit in der Ziege generierten, mit 4nm großen kolloidalen Goldpartikeln gekoppelten Anti-Maus-IgG-Antikörpern (1:200 in PBS mit 1% NSS, Dianova) überschichtet und für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend 2x 5 Minuten in PBS gewaschen (Raumtemperatur) und mit 2% Glutaraldehyd (Merck) in PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur nachfixiert. Nach 5 weiteren Waschschrritten in PBS bei Raumtemperatur zu jeweils 5 Minuten erfolgte das Aufbringen der Silberverstärkungslösung (Biotrend, Köln). Die Reaktion wurde nach 15 Minuten bei deutlich vorliegendem Signal durch 3x5 minütiges Waschen in PBS bei Raumtemperatur gestoppt. Die Schnitte wurden anschließend unter Verwendung von Eukitt eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung des Interferenzkontrastes an einem Leica DMRB Mikroskop und die Herstellung der Photos mit einer angeschlossenen LEICA-Kamera. Kontrollschnitte wurden statt mit Primärantikörperserum mit PBS überschichtet.

#### 3.4.2.2.3 Fluoreszenzmarkierung

Die Darstellung von Cyclooxygenase-2-Protein und von Kollagen IV erfolgte unter Verwendung von mit Cy3 gekoppelten Sekundärantikörpern. Für die Detektion der Cyclooxygenase wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt und nach dem im letzten Abschnitt beschriebenen Protokoll entparaffiniert, gekocht und anschließend in PBS überführt. Zum Darstellen des Kollagen IV wurden 5 µm dicke



Gefrierschnitte im Kryostaten angefertigt, auf mit Chromgelatine beschichtete Objektträger aufgenommen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Anschließend wurden die Schnitte in PBS verbracht. Bei beiden Experimenten wurden die Schnitte nun für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 2% bovinem Serumalbumin in PBS (Kollagen IV) bzw. mit 10% nativem Schweineserum (NSS) in PBS (COX-2) vorbehandelt, ehe sie mit den entsprechenden Primärantikörperverdünnungen überschichtet wurden. Hierzu kam zur Detektion von Kollagen IV eine 1:500 Verdünnung des  $\alpha 1\alpha 2$ -Kollagen IV Antikörpers in PBS und zur Detektion der Cyclooxygenase-2 eine 1:250 Verdünnung des Cyclooxygenase-2-Antikörpers in PBS mit 1% NSS zum Einsatz. Nach der Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler wurden die Schnitte über Nacht bei 4° gelagert. Es folgten 3 fünfminütige Waschschrte in PBS und anschließend das Auftragen einer 1:250 Verdünnung des in der Ziege generierten, mit Cy3 gekoppelten Anti-Kaninchen-IgG-Antikörpers (Dianova, Hamburg) in PBS (Kollagen IV) bzw. das Auftragen einer 1:500 Verdünnung von im Affen generiertem, mit Cy3 gekoppeltem Anti-Ziege-IgG-Antikörper (Dianova) in PBS (COX-2). Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 3x10 Minuten in PBS gewaschen und anschließend unter Verwendung von 50% Glycerin (Merck) in PBS eingedeckelt. Zur Kontrolle wurde jeweils anstelle der Primärantikörperverdünnung PBS eingesetzt. Auf Kontrollschnitten ließ sich kein Immunlabeling nachweisen. Die Beurteilung der Schnitte und die Erstellung der Fotografien erfolgte fluoreszenzmikroskopisch an einem Leica DMRB Mikroskop mit Auflicht-Fluoreszenzzusatz, aufmontierter Kamera (Kollagen IV) und angeschlossener digitaler Spot32-Kamera (COX-2).

### 3.4.3 In situ-Hybridisierung

#### 3.4.3.1 cDNA Präparation

Die verwendeten cDNAs zur Generierung der Riboproben waren alle schon in anderen Experimenten der Gruppe Bachmann zum Einsatz gekommen und lagen in klonierter Form vor. Die cDNA für NOS1 bestand aus einem 1255 Basenpaare langen, partiellen Ratten-NOS1 Fragment, flankiert durch die Promotorstellen der Transkriptionspolymerasen T7 und Sp6 und lag subkloniert in den pGem4-Vektor vor. Das Plasmid wurde dem Labor freundlicherweise von S. H. Snyder (Baltimore, USA) zur Verfügung gestellt. Zur Generierung der Antisenseprobe erfolgte die Linearisierung des Plasmides mit Hilfe von EcoR 1 und die Transkription mit Hilfe der T7 Polymerase. Zur Generierung der Senseprobe wurde mit Kpn 1 linarisiert und mit Sp6 transkribiert. Die cDNA für Renin lag als 330 Basenpaare langes, Sac 1-Pst 1 Fragment des Maus-Reningens (*Ren-2d*, zur Verfügung gestellt von K. Gross, Buffalo, USA), subkloniert in den pSP65-Vektor und einseitig flankiert durch die Promotorsite für Sp6, vor. Die Linearisierung erfolgte unter Verwendung von Acc1 und die Transkription mit Hilfe der Sp6 Transkriptionspolymerase. Zur Generierung der Senseprobe wurde eine in den pSP64 Vektor und einseitig mit Sp6 Promotorsite flankierte cDNA-Probe verwendet [vgl. Bosse et al. 1995]. Die Linearisierung erfolgte mit Kpn 1, die Transkription mit Sp6-Polymerase. Die 712 Basenpaare lange cDNA für den murinen thiazidsensitiven Na-Cl-Kotransporter (NCC), die für die Membrandomänen 1-7 des Proteins kodiert [Obermüller et al. 1995], lag, flankiert durch die Promotorstellen für T3 und T7, subkloniert in die EcoRV site des pBlueskript KS<sup>+</sup> Vektors vor. Das cDNA-Fragment für den bumetanidsensitiven Na-K-2Cl-Kotransporter (NKCC2) umfaßte 375 Basenpaare, kodierte für die Aminosäuren 61-188 des Proteins [Obermüller et al. 1996] und lag ebenfalls, flankiert durch die Promotorstellen für T3 und T7, subkloniert in die EcoRV site des pBlueskript KS<sup>+</sup> Vektor vor. Als Matrize zur Transkription der beiden Kotransporter wurden unter Verwendung vektorspezifischer Primer PCR-Produkte generiert, die die jeweiligen einklonierten cDNA-Abschnitte und die flankierenden Transkriptionspromotoren umfaßten. Die Generierung der Antisenseprobe erfolgte beim NCC mit T7 und beim NKCC2 mit T3, zur Generierung der Senseprobe wurde für den NCC T3 und für den NKCC2 T7 benutzt. Die cDNA für  $\alpha 1$ -Kollagen IV bestand aus einem 1140 Basenpaare langen, partiellen  $\alpha 1$ -Kollagen IV-Fragment, das zum einen für die NC1 Domäne der  $\alpha 1$ -Kette des Kollagen IV kodiert und zum kleineren Teil die 3' untranslatierte Region der mRNA miterfaßt. Die cDNA lag, subkloniert in den pBlueskript SK Vektor, flankiert von Promotorstellen für T3 und T7 vor. Aus dem Plasmid wurde unter Verwendung vektorspezifischer Primer ein PCR-Produkt erzeugt, das als Matrize für die Transkription diente (s.o.). Mittels der Transkriptionspolymerase T3 wurde die Antisenseprobe, mittels T7 die Senseprobe generiert [vgl. Schäfer et al. 1994]. Die zur Detektion von Kollagen I

verwendete cDNA kodiert für ein Fragment des 3' Endes des murinen  $\alpha 1$ -Kollagen I [Metsäranta et al. 1991] und wurde dem Labor freundlicherweise von T. Aigner aus Erlangen-Nürnberg zur Verfügung gestellt. Die cDNA lag, flankiert durch die Promotorstellen der Transkriptionspolymerasen T3 und T7, subkloniert in den pBlueskript KS<sup>+</sup> Vektors vor. Zur Generierung der Antisenseprobe erfolgte die Linearisierung des Plasmides mit Hilfe von EcoR 1 und die Transkription mit Hilfe der T3 Polymerase. Zur Generierung der Senseprobe wurde mit Hind 3 linearisiert und mit T7 transkribiert. Erworben wurden alle Transkriptionspolymerasen von Boehringer. Die jeweiligen cDNA-Proben wurden zwecks Aufreinigung vor der Transkription in Phenol/Chloroform (J.T. Baker) gelöst und unter Verwendung von Lithiumchlorid (4M, Merck) in Ethanol (100%, J.T. Baker) gefällt. Anschließend wurde zur Qualitätskontrolle eine Agarosegel-Elektrophorese (Seakem-ME Agarose, FMC, USA) durchgeführt und die Menge der generierten DNA photometrisch bestimmt (GenQuant2, Pharmacia Biotech, Freiburg).

#### 3.4.3.2 *In vitro*-Transkription

Die zur Durchführung der Transkription der einzelnen cDNAs verwendeten Transkriptionspolymerasen finden aus Gründen der Übersichtlichkeit schon im vorhergehenden Abschnitt Erwähnung. Grundsätzlich wurden für alle Versuche Sense- und Antisenseproben mit Hilfe der entsprechenden Polymerasen generiert. Während die Antisenseproben zum Nachweis der zellulären RNA dienten, mit der sie Hybridverbindungen eingingen, wurden die Senseproben im gleichen Experiment als Kontrollsonden genutzt. Ein Transkriptionsansatz setzte sich jeweils zusammen aus 1  $\mu$ g (Restriktionsfragment) oder 0,2  $\mu$ g (PCR-Produkt) der entsprechenden DNA, gelöst in 14  $\mu$ l mit Diethyl-Pyrocbonat (DEPC, Sigma) behandeltem Wasser, 2  $\mu$ l Transkriptionspuffer, 2  $\mu$ l eines Nukleotidgemisches mit Digoxigenin-gelabeltem Uridintriphosphat (DIG-Labeling-Mix) und 2  $\mu$ l der entsprechenden Transkriptionspolymerase (alles Boehringer). Das Gemisch wurde für 140 Minuten bei 37° inkubiert. Anschließend folgte die Degradation der DNA-Vorlage durch Zugabe von RNase freier DNase (Boehringer) bei 37° für 15 Minuten. Die RNA wurde entsprechend der im vorherigen Abschnitt beschriebenen DNA-Fällung gefällt, mit 80% Ethanol gewaschen und in 50-100  $\mu$ l DEPC-Wasser aufgenommen. Die Qualität der Sonden wurde durch eine Agarosegel-Elektrophorese sichergestellt, die Quantität der enthaltenen RNA photometrisch bestimmt. Da bei entsprechender Sondenlänge (über 400 bp) eine verminderte zelluläre Zugänglichkeit zu erwarten war, wurden alle oben beschriebenen Transkriptionsprodukte, mit Ausnahme der Renin-, NKCC2- und Kollagen I-Sonden durch alkalische Hydrolyse fragmentiert. Hierzu wurden 50  $\mu$ l des gelösten Transkripts mit 50  $\mu$ l eines aus 20  $\mu$ l 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> und 30  $\mu$ l 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (beide Riedel-de-Haën) bestehenden Carbonatpuffers versetzt und bei 60° für die Dauer einer sich aus der Ausgangslänge und Temperatur des Wasserbades errechnenden Zeiteinheit inkubiert (zwischen 45 und 60 Minuten, je nach Sonde). Die Fällung des Hydrolysates erfolgte entsprechend wie bei der Transkription. In der Regel wurden frische Hydrolysate/Transkriptionsprodukte als Sonden eingesetzt.

#### 3.4.3.3 *Hybridisierung mit Digoxigenin-gelabelten Riboproben*

Zur Durchführung der In situ-Hybridisierung wurden 7  $\mu$ m dicke Gefrierschnitte verwendet. Nach dem Schneiden im Kryostaten wurden die Schnitte auf silanisierte (1% Aminopropyltriethoxysilan in Wasser, Sigma) Objektträger verbracht und für 15 Minuten in 4° kaltem, 4 prozentigen Paraformaldehyd (pH 7,4) nachfixiert. Es folgten Waschschrte mit 3x5 Minuten PBS, 2x5 Minuten Wasser und erneut 2x5 Minuten PBS bei Raumtemperatur, bevor die Gewebsschnitte zur Aufschlüsselung von Proteinbindungen, die das Eindringen der Riboproben erschweren könnten, für 10 Minuten in 0,1 M HCl inkubiert wurden. Nach dem Acetylierungsschritt, der mit 0,25% Essigsäure (J.T. Baker) in 0,1 M Triethanolamin (Sigma) bei einem pH von 7,4 für 20 Minuten und 2x5 Minuten PBS durchgeführt wurde, erfolgte die Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 80%, 96% für jeweils 5 Minuten), die durch das 20 minütige Trocknenlassen der Gewebsschnitte an der Luft abgeschlossen wurde. Nach Übersichtung mit 100  $\mu$ l Prähybridmix pro Schnitt, der sich zusammensetzte aus 50% deionisiertem Formamid (Merck) und 50% DEPC-H<sub>2</sub>O mit 2,5x Denhardt's (50x=0,5 g Ficoll 400, 0,5 g Polyvinylpyrrolidon, 0,5 g bovines Serumalbumin (alles

Boehringer) ad 50 ml DEPC-H<sub>2</sub>O), 25 mM EDTA (Roth) mit einem pH von 8,0, 40 mM Tris-HCl (Trometamol (Merck)/HCl (J.T. Baker) mit einem pH von 7,4), 0,25 mg/ml t-RNA (Boehringer) und 20mM NaCl (Merck), wurden die Schnitte für 2 Stunden bei 40° in einer mit Wasser befeuchteten Kammer inkubiert und nach Absaugen mit Hybridmix bedeckt. Der Hybridmix setzte sich zusammen aus 50% deionisiertem Formamid, 40% DEPC- H<sub>2</sub>O mit 10x Denhardt's, 1mM EDTA (pH 8), 200mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mg/ml t-RNA, 330 mM NaCl, 1mg/ml Heringssperma-DNA (Boehringer), 0,2 M Dithiothreitol (Biomol, Hamburg), 10% Dextransulfat (Sigma) und 6-12 pg Digoxigenin-gelabelter Riboprobe. Die Gewebsschnitte wurden anschließend, um sie gegen Austrocknung zu schützen, mit silanisierten Deckgläsern (Sigmacoat, Sigma) bedeckt und für einen Zeitraum von 16-22 Stunden bei 40° in einer befeuchteten Kammer inkubiert. Die exakte Menge der zuzugegebenen Riboproben wurde in Vorversuchen bestimmt. Des weiteren wurden in jedem Versuchsansatz auch die entsprechenden Sense-Riboproben als Kontrollen verwendet. Hybridisierung mit der Sense-Probe führte in allen Experimenten zu einem Ausbleiben des Signals. Bis zu diesem Punkt der Experimente wurde für das Herstellen der Lösungen und das Befeuchten der Kammern ausschließlich autoklaviertes Wasser verwendet.

#### *3.4.3.4 Waschen der Gewebsschnitte zur Entfernung nicht hybridisierter, markierter Riboproben*

Nach der Hybridisierung wurden die Objektträger mit den aufgelegten silanisierten Deckgläsern in eine 40 ° warme Lösung aus 2xSSC (standard sodium citrat (1x): 15%Natriumcitrat (Merck) und 18% Natriumchlorid in Wasser) überführt, wodurch sich die Deckgläsern von den Objektträgern lösten. In der gleichen Lösung wurden die Schnitte für 30 Minuten belassen. Nach drei weiteren Waschschritten bei 40 ° (60 Minuten in 1xSSC mit 50% deionisiertem Formamid, 60 Minuten in 0,375% SSC/50%, 0,2x SSC/ 50% Formamid für 30 Minuten) erfolgten drei weitere Waschschrritte bei Raumtemperatur (je zweimal 0,5x SSC für 10 Minuten und 0,2x SSC für 10 Minuten).

#### *3.4.3.5 Detektion und Darstellung der hybridisierten Riboproben*

Nach einer zehnminütigen Inkubation in Puffer 1 (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl in Wasser mit einem pH von 7,5) wurden die Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit jeweils 100 µl modifiziertem Blockingmedium (1% Boehringer Blocking Reagenz und 0,5% bovines Serumalbumin in Puffer 1) bedeckt. Anschließend folgte die Inkubation in einer feuchten Kammer mit einem an alkalische Phosphatase gekoppelten Antidigoxigenin-Antikörper (1:500 in modifiziertem Blockingmedium) für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler, bevor die Schnitte bei 4° über Nacht gelagert wurden. Nach zwei fünfzehnminütigen Waschschrritten in Puffer 1 bei Raumtemperatur wurden die Schnitte für 2 Minuten in Puffer 3 (100mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, in Wasser, pH 9,5) equilibriert und anschließend mit 100 µl Entwicklungspuffer, bestehend aus 4,5 µl/ml Nitro-blue Tetrazolium (75 mg/ml in 70% Dimethylformamid, Boehringer), 3,5µl/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (50mg/ml in 100% Dimethylformamid) als Substrate der Phosphatase und Levamisole (Sigma) zum Blocken der endogenen Phosphatasen gelöst in Puffer 3, bedeckt und unter Lichtabschluß in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur/4° entwickelt. Das Abstoppen der Signalentwicklung erfolgte je nach Intensität des Signales und gewählter Umgebungstemperatur nach 6-24 Stunden durch das Verbringen der Schnitte in Puffer 4 (100mM Tris-HCl, 1mM EDTA in Wasser, pH 8,0) für 2x15 Minuten bei Raumtemperatur und das anschließende Waschen für 2x15 Minuten in PBS bei Raumtemperatur. In der Folge wurden die Schnitte mit 50% Glycerin in PBS eingedeckelt und unter einem Leica DMRB- Mikroskop mit und ohne Verwendung des Interferenzkontrastes begutachtet. Das Erstellen der Fotografien erfolgte mit einer angeschlossenen Leica-Kamera. Die Gewebsschnitte der Nieren aller Tiere aller Versuchsgruppen wurden jeweils in einem Experiment gemeinsam prozessiert und ausgewertet. Das Abstoppen der Entwicklungsreaktion erfolgte ebenfalls für alle Schnitte simultan.

### 3.5 Statistische Auswertung

#### 3.5.1 Quantifizierung der Signale

Die Behandlung aller Gewebsschnitte aller Versuchstiere erfolgte jeweils im gleichen Experiment unter exakt gleichen, standardisierten, histochemischen Bedingungen, bei gleicher Temperatur und gleicher Expositions- und Entwicklungszeit. Zur Beurteilung der unterschiedlichen Enzymaktivität der NO-Synthase 1 wurden die jeweils signalpositiven Zellen der Maculae Densae auf 2 Gewebsschnitten pro Versuchstier gezählt und zur Gesamtzahl der auf den Schnitten vorhandenen Glomerula (400-600) ins Verhältnis gesetzt. Die Kolo-kalisation von NADPH-Diaphorasereaktion und NOS-Protein kann als etabliert angesehen werden [Bachmann et al. 1995]. Es wurde angenommen, dass sich die Intensität der NADPH-Diaphorasereaktion auf Gewebsschnitten perfusionsfixierter Nieren proportional zur Aktivität der NO-Synthase 1 und zur Menge des synthetisierten NO verhält. Die Quantifizierungsmethode basiert des Weiteren auf der Beobachtung, dass unter physiologischen Bedingungen nur ein Teil der MD-Zellen positive Diaphorasereaktivität aufweist, während die meisten MD-Zellen eine NOS-Aktivität aufweisen, die nicht ausreicht, eine positive Reaktion zu erzeugen und somit in diesen Zellen keine Farbentwicklung erfolgt. Lag nun aber eine Stimulation der NOS1-Aktivität vor, so wurde davon ausgegangen, dass bei einigen dieser Zellen die NOS1-Aktivität über die Nachweisgrenze anstieg und damit eine größere Anzahl Zellen als Zeichen insgesamt gesteigerter Aktivität Diaphorase-positiv wurden. In gleicher Weise wurde die Expression der NOS1-mRNA quantifiziert. Da eine komplett gleiche Behandlung der Gewebsschnitte aller Versuchstiere sichergestellt war, wurde davon ausgegangen, dass eine Erhöhung der Anzahl NOS1-mRNA-positiver MD-Zellen (d.h. eine erhöhte Anzahl derjenigen Zellen, bei denen die Expression von NOS1-mRNA über der Nachweisgrenze der Methode lag) ein Maß für die Erhöhung der Transkriptionsrate von NOS1 in der Macula densa darstellt. Analog zur Auswertung der Diaphorasereaktion wurden auch hier jeweils 2 Gewebsschnitte der Niere pro Versuchstier gewertet und das Verhältnis aus positiven Zellen zur Gesamtzahl der auf den Schnitten erkennbaren Glomerula (400-600) gebildet. Ebenfalls analog zu dieser Methodik wurde jeweils 1 Gewebsschnitt pro Versuchstier (200-300 Glomerula) im Hinblick auf Cyclooxygenase-2-Protein-positiv Immunreaktivität ausgewertet. Auch hier wurde ein Verhältnis aus positiven Zellen und Gesamtzahl der gezählten Glomerula gebildet. Zur Beurteilung des Reninstatus auf mRNA und Proteinebene war diese Methode allerdings nur in abgewandelter Form verwendbar, da die Zellgrenzen der Renin-synthetisierenden Zellen der afferenten Arteriole sich auf 5/7 µm dicken, ungefärbten Schnitten nicht sicher abgrenzen lassen. In diesem Fall beruht die Quantifizierung des Reningehaltes auf dem gut belegten Umstand, dass es unter verschiedenartigster Stimulation der Reninsynthese zu einer metaplastischen Transformation von glattemuskulären Zellen der afferenten Arteriole zu Renin-synthetisierenden Zellen kommt, was zu einem verstärkten und vor allem zu einem sich nach proximal in der afferenten Arteriole ausdehnenden Signal führen muß. Dies erhöht unter Vorliegen von die Renin-Synthese stimulierenden Bedingungen die Wahrscheinlichkeit, dass auf einem Anschnitt Renin-positiv afferente Arteriolen getroffen werden. Daher wurde angenommen, dass die gezählte Anzahl positiver afferenter Arteriolen pro Gewebsschnitt ein Maß für die Synthese von Renin mRNA und Protein in der afferenten Arteriole darstellt. Die hier beschriebenen Quantifizierungsmethoden können als etabliert angesehen werden [vgl. Bosse et al. 1995]. Des Weiteren hat diese Methode der Quantifizierung den Vorteil mit erheblich weniger methodischen Fehlern behaftet zu sein, als beispielsweise eine Quantifizierung auf dem Boden densitometrischer Computerauswertung, wiewohl sie natürlich erheblich größere Werte liefert. Außerdem ist sie der RNA/Protein-Extraktion mit Blot insofern überlegen, als dass lediglich extrem wenig Zellen, gemessen an der Gesamtzahl aller renaler Zellen, in die Regulation am JGA involviert sind, was die quantitative Auswertung eines Blots mit RNA/Protein-Extrakt stark erschwert.

#### 3.5.2 Statistische Tests

Zur Auswertung und zum Vergleich der einzelnen Gruppen kam der Mann-Whitney-U-Test zum Einsatz. Die Wahl des statistischen Vergleichsverfahrens fiel vor allem aus zwei Gründen auf den Mann-Whitney-U-Test. Zum Ersten verlangt er im Gegensatz zum t-Test keine Normalverteilung der zu vergleichenden Variablen. Und zum Zweiten sind die Ergebnisse des Tests als relativ ausreißerresistent anzusehen. Einzige Bedingung zur Durchführung ist die Unabhängigkeit der

vergleichenen Variablen voneinander. Diese Bedingung war erfüllt. Zur Durchführung des Tests wurden zunächst die Werte der zu vergleichenden Gruppen in eine Rangfolge gebracht und jedem Wert ein Rangwert, beginnend mit 1 für den kleinsten Wert, zugeordnet. Anschließend wurde die Summe der Rangwerte für die zu vergleichenden Gruppen gebildet als Summe( $R_1$ ) und Summe ( $R_2$ ). Es folgte die Berechnung der beiden U-Werte für die entsprechenden Gruppen mit

$$U_1 = (n_1 \cdot n_2) + \{n_1 \cdot (n_1 + 1)\} / 2 - \text{Summe}(R_1)$$

$$U_2 = (n_2 \cdot n_1) + \{n_2 \cdot (n_2 + 1)\} / 2 - \text{Summe}(R_2)$$

und die Überprüfung auf ihre Signifikanz hin in einer U-Wert-Tabelle (jedes handelsübliche Statistikhandbuch). Ein p-Wert kleiner 0,025 wurde für den zweiseitigen Test als signifikant angesehen und die Nullhypothese in diesem Fall verworfen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Klinische Parameter

Die Ratten der FHH8 und der FHH16 Gruppen zeigten systolische Blutdruckwerte von  $156 \pm 12$  mmHg (FHH8) und  $160 \pm 17$  mmHg (FHH16). Im Vergleich zu anderen spontan hypertensiven Ratten (z.B. Spontaneously Hypertensive Rats mit Werten um die 220 mmHg) sind dies zwar keine extrem erhöhten Werte, es bestand aber im Vergleich zur Kontrollgruppe FHL16 mit Werten von  $138 \pm 18$  mmHg ein signifikant erhöhter systolischer Blutdruck. Ein Wert von 138 mmHg kann allerdings im Vergleich zu normotensiven Rattenstämmen (z.B. Wistar Kyoto Rats um die 125-130 mmHg) ebenfalls noch als leichte Blutdruckerhöhung angesehen werden. Bei der Untersuchung der Proteinexkretion im Urin wiesen FHL16 und FHH8-Ratten mit Werten von  $24 \pm 4$  mg/d (FHL16) und  $19 \pm 3$  mg/d nur eine geringe Proteinurie auf. Im Gegensatz dazu zeigten die Messungen der Proteinexkretion für FHH16-Ratten eine hochsignifikante Erhöhung auf Werte von  $217 \pm 14$  mg/d.

Tabelle 3: Mittelwerte des systolischen Blutdrucks und der Proteinexkretion im Urin in den einzelnen Versuchsgruppen. Die Werte sind  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Signifikant (\*) erhöhte Proteinexkretion bei FHH16 im Vergleich zu FHL16 und FHH8. Moderater, aber signifikant (\*) erhöhter Blutdruck bei FHH8 und FHH16 im Vergleich zu FHL16.

	UpV (in mg/d)	SBP (in mmHg)
<b>FHL16 (n=4)</b>	$24 \pm 4$	$138 \pm 18$
<b>FHH8 (n=4)</b>	$19 \pm 3^*$	$156 \pm 12^*$
<b>FHH16 (n=5)</b>	$217 \pm 14^*$	$160 \pm 17^*$

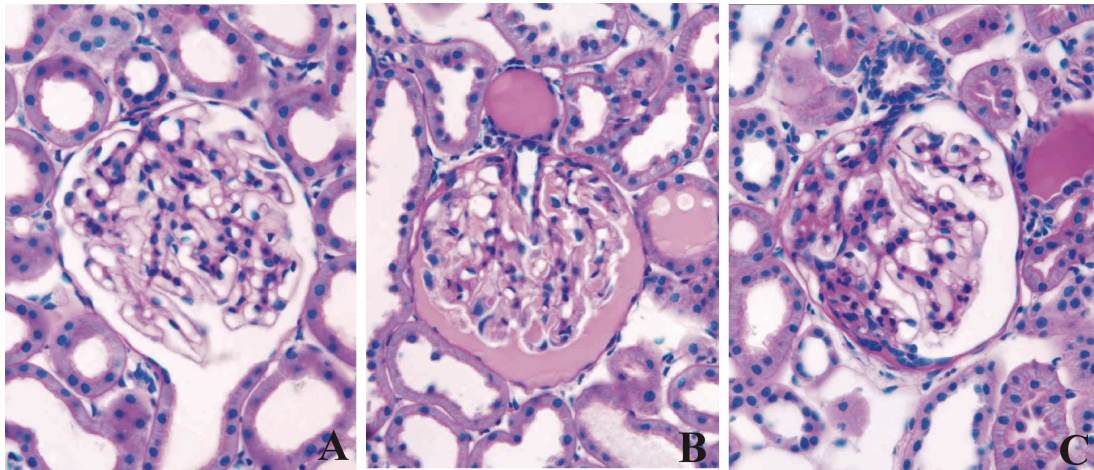


Abbildung 1: Exemplarische Darstellung von Glomerula aus den Nieren von FHH8 und FHH16-Ratten in der PAS-Färbung. Das mit **(A)** bezeichnete Glomerulum der FHH8-Ratte erscheint morphologisch unverändert. In **(B)** erkennt man in einem Glomerulum der FHH16-Ratte einen partiellen Kollaps des glomerulären Gefäßknäuels mit einzelnen, die Kapillaren füllenden hyalinen Thromben. Der Harnraum und einige Tubulusanschnitte erscheinen gefüllt mit einer proteinösen Flüssigkeit. In **(C)** kommt das klassische Bild der segmentalen Glomerulosklerose einer FHH16-Ratte zur Darstellung. Der untere Teil des Glomerulum erscheint komplett sklerotisiert bei erhaltener Architektur des oberen Bereichs des Gefäßknäuels. Ungefähre Vergrößerung **(A-C)** x250

## 4.2 Histopathologische Veränderungen

### 4.2.1 Glomeruläre und interstitielle Veränderungen

Die glomerulären und interstitiellen Schädigungen, die im Rahmen der histopathologischen Begutachtung von Nieren der FHH16 Ratten festgestellt werden konnten, zeigten sowohl innerhalb der Nieren der einzelnen Versuchstiere als auch im Vergleich der Nieren von Tieren der gleichen Versuchsgruppe eine sehr starke Streuung. Die verschiedenen Stadien der FSGS, beginnend mit einer leichten Aufweitung des Primärastes der afferenten Arteriole bis zur kompletten Sklerosierung eines Glomerulum, lagen häufig direkt nebeneinander vor. Die in dieser Arbeit gesehenen glomerulären und interstitiellen Veränderungen seien hier als Schädigungssequenz im Sinne einer vom vaskulären Pol ausgehenden, im pathologisch-anatomischen Sinne „klassischen“ fokal segmentalen Glomerulosklerose beschrieben. Die glomerulären Veränderungen gestalteten sich, wie zu erwarten war, außerordentlich variabel (fokal und segmental). Neben licht- und elektronenmikroskopisch völlig intakten Glomerula fanden sich Glomerula mit Aufweitungen der am vaskulären Pol als Primäräste aus der afferenten Arteriole entspringenden Kapillaren mit einer Entfaltung und Ausziehung der normalerweise gewundenen kapillären Struktur, die im Extremfall dazu führte, dass eine aufgeweitete Kapillare vom vaskulären bis zum Harnpol zu verfolgen war. Eine elektronenmikroskopisch nachweisbare Verschmelzung der Fußfortsätze der viszerale Epithelien (Podozyten), ein unspezifisches Schädigungszeichen, das auch im Rahmen einer Reihe anderer glomerulärer Erkrankungen (diverse Glomerulonephritiden) vorkommt, fand sich in teilsklerotischen Glomerula sowohl in geschädigten Bereichen als auch in lichtmikroskopisch nicht betroffenen Arealen. Weitere schon in frühen Läsionen vorhandene podozytäre Schädigungszeichen umfaßten Vakuolenbildung im Bereich der Zellkörper, Abheben der Podozyten von der glomerulären Basalmembran und Ausziehung ihrer Zellkörper und Fußfortsätze. Die Ränder sklerotischer Bereiche zeichneten sich des weiteren durch das Vorhandensein von Anhaftungen dilatierter, durch podozytären Zelluntergang denudierter Bereiche der glomerulären Basalmembran von Kapillarschlingen an das parietale Epithel der Bowman-Kapsel aus. Diese Anhaftungen lagen regelhaft assoziiert zum vaskulären Pol des Glomerulum und erstreckten sich je nach Ausprägung bis zum Harnpol. Bei fortgeschrittenen sklerotischen Läsionen kam es schließlich zu einem Abheben der parietalen Epithelien von ihrer Basalmembran, wodurch ein paraglomerulärer Raum entstand, der zum einen begrenzt wurde durch das mit dem sklerotischen Bereich „verbackene“ parietale Epithel und

zum anderen eine Abgrenzung gegen das interstitielle Gewebe durch mehrere Lagen Fibroblasten erfuhr. Dieser paraglomeruläre Raum erschien gefüllt mit einer PAS-positiven, proteinösen Flüssigkeit, in der einzelne dunklere, granuläre Strukturen abzugrenzen waren, die als Zelldebris untergegangener Zellen und Reste der Basalmembran des parietalen Epithels gedeutet wurden. Die im Bereich der Sklerose liegenden Kapillarschlingen erschienen teils kollabiert, teils hyalinisiert mit einzelnen extrem dilatierten Bereichen, sogenannten Mikroaneurismata. Der Inhalt der sklerotischen Areale bestand in erster Linie aus Anteilen der Basalmembran, die durch Kollaps der Schlingen aufgefältelt vorlag und Bereichen der ehemaligen mesangialen Matrix mit vereinzelt lebenden Zellen ohne strukturellen Zusammenhang, neben Zelldebris und hyalinen PAS-positiven Einlagerungen. Die Podozyten, die in dem Bereich, der an die Anheftungsstelle angrenzte, die glomeruläre Basalmembran bedeckten, zeigten die oben beschriebenen zellulären Schädigungszeichen in ausgeprägter Form. Die mesangiale Matrix erschien allenfalls geringgradig vermehrt, mesangiale Zellproliferation wurde nicht gesehen. Allerdings ließen sich vereinzelt Glomerula ausmachen, die partiell einen Kollaps des Gefäßknäuels aufwiesen. Diese waren gekennzeichnet durch einen Kollaps der Kapillarschlingen und eine durch die erhöhte zentrale Gewebsdichte scheinbare mesangiale Matrixvermehrung. Den Harnraum dieser Glomerula füllten nicht selten proteinöse Ausgüsse. Weitere einzelne Glomerula waren vollständig hyalinisiert und komplett fibrös durchbaut und erfüllten so die Kriterien einer globalen Sklerose. Proximale Tubulusepithelien im Bereich sklerotischer Glomerula erschienen dilatiert und ebenfalls mit proteinösen Zylindern gefüllt. Das proximale Tubulusepithel in geschädigten Bereichen zeigte reichlich Resorptionsvakuolen und eine ausgeprägte subepitheliale Begleitfibrosierung. Die oben beschriebenen paraglomerulären Räume setzten sich in einigen Fällen bis unter das proximale Tubulusepithel fort. Im Gegensatz zu den deutlichen Schädigungen der Nieren der FHH16-Ratten zeigten sich bei den FHH8-Ratten nahezu keine Schädigungszeichen. Allenfalls vereinzelte Bereiche beginnender Sklerosierung und eine allerdings sehr dezente diffuse mesangiale Matrixvermehrung waren zu vermuten. Glomeruläre Schädigungen und interstitielle Veränderungen fehlten in den Nieren von FHL16-Ratten völlig (vgl. Abbildung 1 und 2).



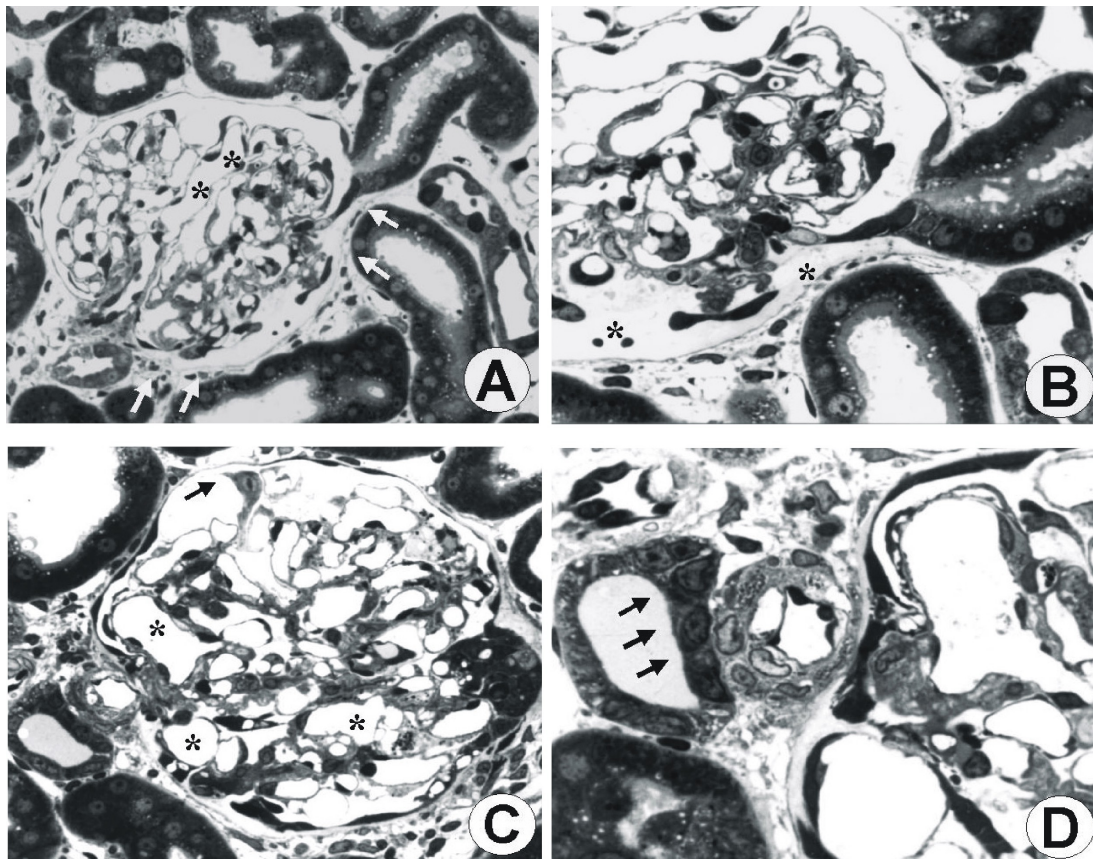


Abbildung 2: Segmental geschädigte Glomerula von FHH16-Ratten. **(A)** Segmentale vom Gefäß- bis zum Harnpol reichende Sklerose. Der obere Anteil des Glomerulum erscheint unbeschädigt. Die mit (\*) gekennzeichnete Kapillare zieht aufgeweitet und entfaltet über die ganze Länge des glomerulären Gefäßknäuels. Deutlich zu erkennen ist der mit (▸) gekennzeichnete, unter Zellen der Bowman-Kapsel neu entstandene paraglomeruläre Raum. In der den paraglomerulären Raum füllenden proteinösen Flüssigkeit sind einzelne Zelltrümmer eingelagert. Die Kapillaren in der sklerotischen Region erscheinen kollabiert. Vergrößerung x250. **(B)** Ausschnittsvergrößerung (x800) des Glomerulum aus **(A)**. Man erkennt den sich von unter der Bowman-Kapsel bis unter das proximale Tubulusepithel fortsetzenden, paraglomerulären Raum (\*). Ebenfalls gut zu erkennen ist die den Raum zum umgebenden Gewebe abgrenzende Fibroblastenschicht, während das parietale Epithel in die sklerotische Region „verbacken“ erscheint. In **(C)** kommt ein schwerer geschädigtes Glomerulum zur Darstellung. Durch (▸) gekennzeichnet sieht man einen von der Basalmembran abgehobenen Podozytenzellkörper. Mehrere mit (\*) bezeichnete Glomerulumkapillaren bilden Mikroaneurismata aus. Der auf dem Bild unten liegende Anteil erscheint komplett mit der parietalen Epithelschicht fusioniert. Vergrößerung x350. **(D)** zeigt den JGA mit MD (▸) und afferenter Arteriole in einer Ausschnittsvergrößerung (x1000) des in **(C)** zur Darstellung kommenden Glomerulum. Die Wand der afferenten Arteriole ist verdickt, man erkennt ausgeprägte subepitheliale Blasenbildung. Des weiteren gut zu erkennen sind die Reningranulationen in der glattmuskulären Gefäßschicht, die das Gefäß als afferente Arteriole identifizieren.

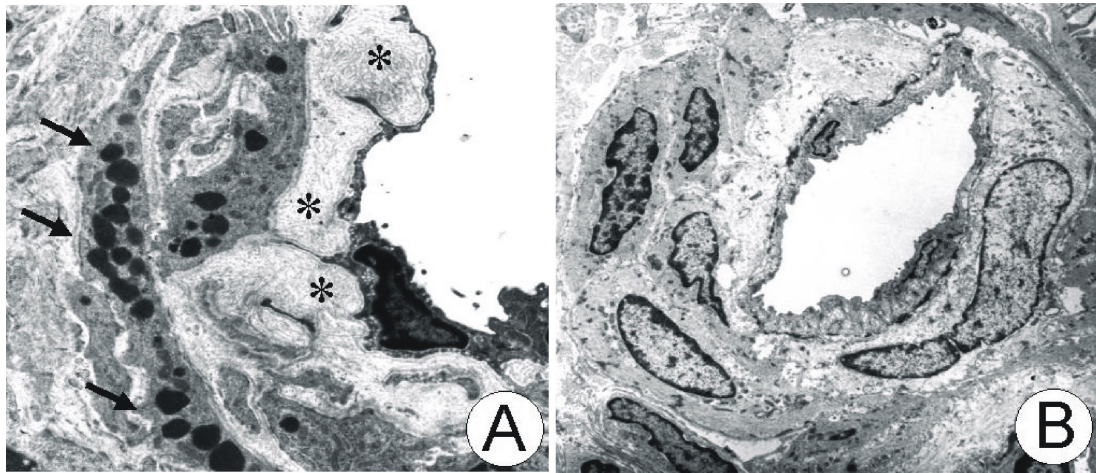


Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Darstellung der Arteriopathie am vaskulären Glomerulumpol von FHH16-Ratten. **(A)** Der Ausschnitt zeigt einen glomerulurnahen Anschnitt einer afferenten Arteriole. Man erkennt deutliche subendotheliale Hyalinablagerungen (\*), eine juxtaglomeruläre granuliert Zelle ist an den spezifischen Reningranulationen erkennbar (P). **(B)** Ausgeprägte Mediahypertrophie im Bereich einer afferenten Arteriole. Erkennbar sind weiterhin deutliche degenerative Veränderungen in den im Anschnitt getroffenen glatten Muskelzellen. Vergrößerung **(A,B)** x 4500

#### 4.2.2 Gefäßveränderungen

Neben glomerulären und interstitiellen Veränderungen lagen bei FHH16-Ratten zusätzlich Gefäßveränderungen im Sinne einer hypertensiven Arteriopathie vor. Die Ausprägung der Gefäßveränderungen schwankte ebenso wie die glomerulären Schädigungen von Tier zu Tier erheblich. Die Tunica media der Interlobulararterien und der prä- und postglomerulären Kapillaren zeigte im Vergleich zur Media der FHL16-Ratten eine stark ausgeprägte Hypertrophie, wie durch den immunhistochemischen Nachweis von glattmuskulärem Aktin gezeigt werden konnte (vgl. Abbildung 4). Ebenso evident waren Zeichen einer hyalinen Arteriosklerose mit wechselnd stark ausgeprägten subendothelialen Ablagerungen von hyalinem Material. Diese Befunde ließen sich auch elektronenmikroskopisch bestätigen (vgl. Abbildung 3). Aber auch schwerere arterioläre Schädigungen mit fibrinoiden Nekrosen, Karyorhexis und Untergang glattmuskulärer Zellen bis zum Abheben des Endothels von seiner Basalmembran und Veränderungen im Sinne einer hyperplastischen Arteriopathie waren im Bereich einiger weniger afferenter Arteriolen nachweisbar. Im Bereich der Gefäße von FHL16 und FHH8-Ratten konnten keine pathologischen Befunde erhoben werden.

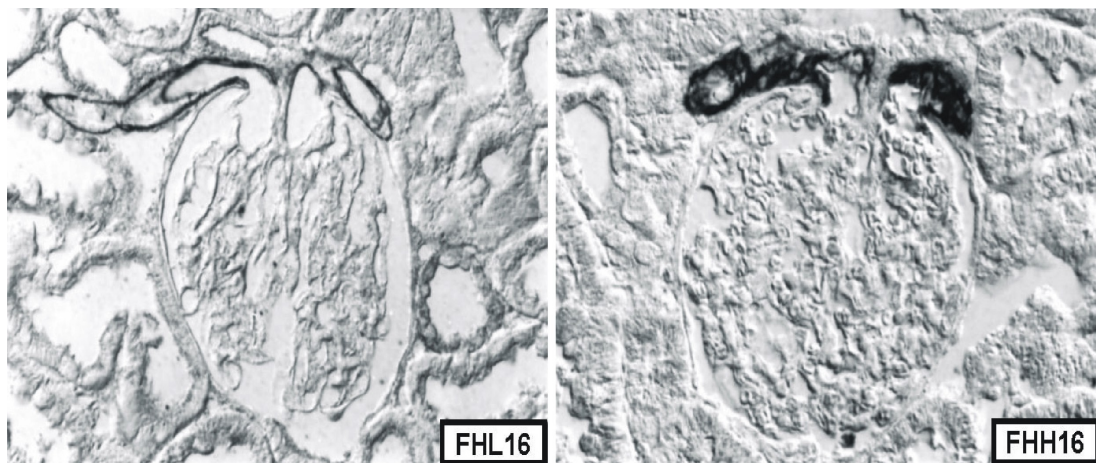


Abbildung 4: Silberverstärkte Goldmarkierung des glattmuskulären Aktins in Vas afferens und efferens. Man erkennt den im Vergleich zur zarten glattmuskulären Lamina der Glomerulumgefäße einer FHL-16 Ratte extrem verdickten Muskelanteil der Polgefäße einer FHH16-Ratte. Vergrößerung beide x500.

#### 4.2.3 Quantifizierung der sklerotischen Läsionen

Der Mittelwert der deutlich sklerotischen Glomerula in den Nieren der FHH16-Ratten, berechnet auf 100 gezählte Glomerula, lag mit  $23,48 \pm 6,64\%$  signifikant über den Werten für FHL16 mit  $0,85 \pm 0,32\%$  und FHH8 mit  $1,58 \pm 0,57\%$  (vgl. Abbildung 5). Diese Werte müssen aufgrund der sehr groben und vom histopathologischen Standpunkt aus ungenauen Bewertungskriterien (keine Unterscheidung mäßiger und schwer geschädigter Glomerula, schwierige Einteilung von Grenzfällen mit beginnender Sklerose) als Näherungswerte verstanden werden (siehe Diskussion).

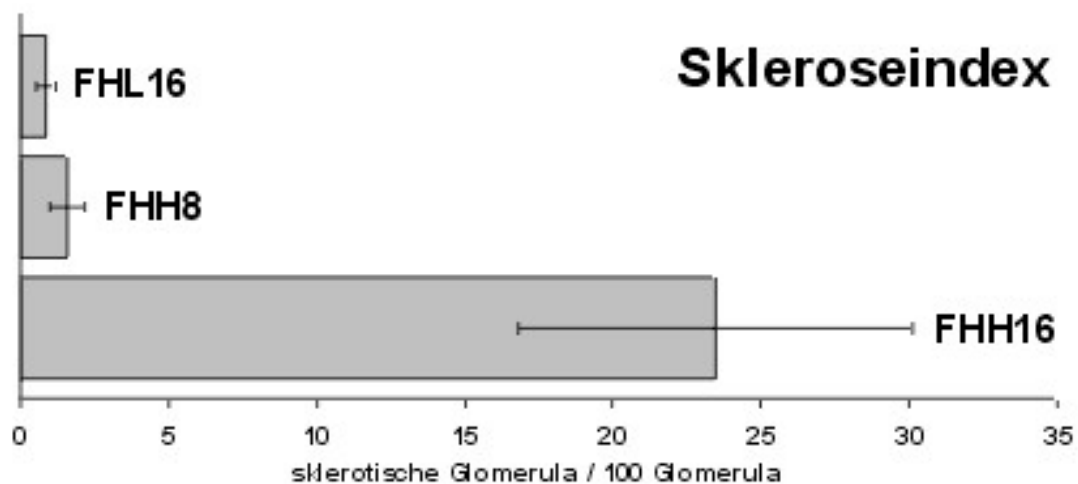


Abbildung 5: Signifikantes Vorliegen einer fokal segmentalen Glomerulosklerose bei Ratten der FHH16-Gruppe im Vergleich zu Tieren der FHH8 und FHL16-Gruppe.



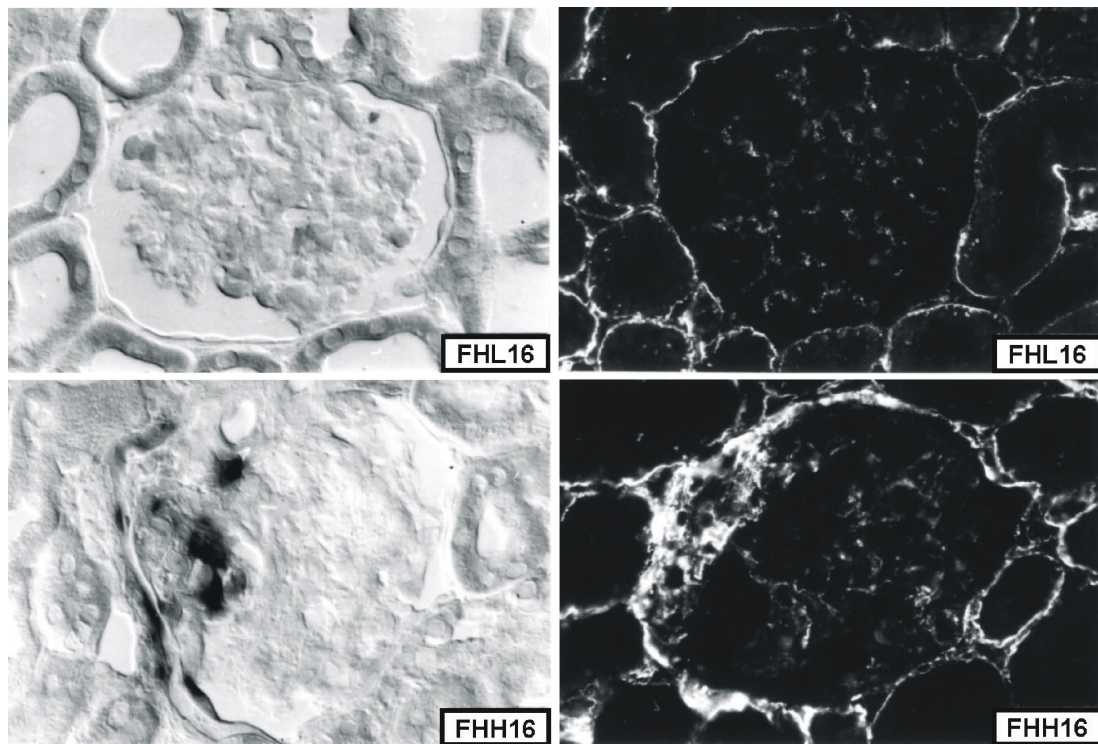


Abbildung 6: Verteilung von Kollagen IV mRNA und Protein in Glomerula von FHL16 (**oben**) und FHH16 Ratten (**unten**), nachgewiesen durch In situ-Hybridisierung (**links**) und Immunofluoreszenz (**rechts**). Im Bereich der sklerotischen Läsion zeigt sich im Glomerulum der FHH-Ratte in vereinzelt Zellen, die Mesangialzellen und parietalen Kapsel epithelien entsprechen, ebenso wie in nicht in die Sklerose einbezogenen angrenzenden Bowman-Kapselzellen und subsklerotisch gelegenen interstitiellen Fibroblasten eine vermehrte Kollagen IV-Expression. Im Vergleich hierzu lagen die Level für Kollagen IV mRNA in Glomerula der FHL16 Gruppe unter der Nachweisgrenze. In der Immunfluoreszenz für Kollagen IV zeigt sich im sklerotischen Glomerulum der FHH16-Ratte eine starke Einlagerung des Proteins im Bereich der Sklerose. Die Fluoreszenz im Bereich der Basalmembran des parietalen Epithels und des Tubulusepithels erscheint vermehrt im Vergleich zu einem „gesunden“ Glomerulum der FHL16-Gruppe. Alle Vergrößerungen ungefähr x300.

### 4.3 Kollagen IV und Kollagen I

Immunlabeling für Kollagen IV und mRNA-Expression von  $\alpha 1$ -Kollagen IV und Kollagen I wurden untersucht mit dem Ziel, zum einen die Matrixkomponente der Sklerosierung genauer zu determinieren, zum zweiten um die Ergebnisse mit ähnlichen Arbeiten an fokal sklerotischen Glomerula bei humaner FSGS zu vergleichen [Büyükbabani et al. 1994, Cai et al. 1996]. Expression von Kollagen IV-mRNA, die über der Nachweisgrenze nach unserem Protokoll lag, zeigten vor allem Zellen im Bereich der sklerotischen Regionen geschädigter Glomerula. Diese ließen sich morphologisch als Mesangiumzellen und parietale Epithelzellen identifizieren. Auch das an die sklerotische Region angrenzende parietale Epithel zeigte ebenso wie die den paraglomerulären Raum zum Interstitium hin abgrenzende Fibroblastenzellschicht regelhaft verstärkte Expression von Kollagen IV-mRNA.. Das nahe dem Harnpol gelegene proximale Tubulusepithel geschädigter Nephronen wies ebenfalls eine stark erhöhte Kollagen IV-mRNA-Expression auf, während die mRNA-Spiegel von Tubuli, Glomerula und Interstitium in den Nieren von FHH8 und FHL16- Ratten unter der Detektionsgrenze der nichtradioaktiven In situ-Hybridisierung lagen. Passend hierzu zeigte der immunhistochemische Nachweis von Kollagen IV-Protein deutliche Anreicherungen des Proteins im Bereich der sklerotischen Läsionen. Außerdem ließen sich im Bereich der verdickten Basalmembranen des parietalen Epithels und des proximalen Tubulus geschädigter Glomerula ausgeprägte Kollagen IV-Einlagerungen nachweisen. In nicht sklerotischen Anteilen geschädigter und in nicht geschädigten Glomerula der FHH16-Ratten ebenso wie in Glomerula der FHH8 und FHL16- Gruppen kamen die Basalmembranen von parietalem Epithel und proximalem Tubulusepithel nur zart

zur Darstellung (vgl. Abbildung 6). Die Expression von Kollagen I-mRNA zeigte keinerlei Erhöhung, weder im Bereich sklerotischer Läsionen noch im Bereich des Tubulusepithels oder des Interstitiums. Nachgewiesen wurde an allen untersuchten Nieren lediglich das reguläre Expressionsmuster, bestehend aus mRNA-Nachweis für Kollagen I in subkapsulären und perivaskulär gelegenen Fibroblasten.

#### **4.4 Natrium-Kalium-2-Chlorid-Kotransporter**

Die Expression von NKCC2-mRNA wurde untersucht, da der Transporter für den Salztransport an der Macula densa und damit für die Kontrolle des tubuloglomerulären Feedbacks (TGF) die entscheidende Rolle spielt [Schnermann et al. 1998]. Es zeigte sich eine Expression entlang des gesamten dicken Teils der aufsteigenden Henleschen Schleife (TAL) inklusive der Macula densa und eines kurzen post-MD-Segments auf allen Gewebsschnitten aller Tiere (vgl. Abbildung 7). Unterschiede in der Menge der exprimierten mRNA (und damit der Intensität der Markierung in der In situ-Hybridisierung) in MD-Zellen und im restlichen TAL zwischen den einzelnen Versuchsgruppen ließen sich nicht nachweisen. Es zeigte sich auch keine Rekrutierung von im normalen Rattenephron NKCC2-negativen Tubulusarealen im distal gewundenen Tubulusbereich (DCT). Die Auswertung der Schnitte erfolgte allerdings nur grob quantitativ durch Abschätzung der Stärke und Ausdehnung des Signals in geringer und starker Vergrößerung mit besonderer Durchmusterung der MD-Zellen, so dass geringe Unterschiede im Expressionsmuster zwischen den einzelnen Tieren nicht ausgeschlossen werden können. Allerdings erscheinen durch die Untersuchung in jedem Fall grobe Abweichungen (wie beispielsweise Nicht-Expression des NKCC2 in der Macula densa) unwahrscheinlich. Zusätzlich wurde noch die Expression des NCC untersucht, der allerdings im DCT lokalisiert ist [nähere Informationen in Bachmann et al. 1998] und mit dem MD-Salztransport nichts zu tun hat. Auch hier zeigte sich bei allen Tieren das gleiche physiologische Expressionsmuster.

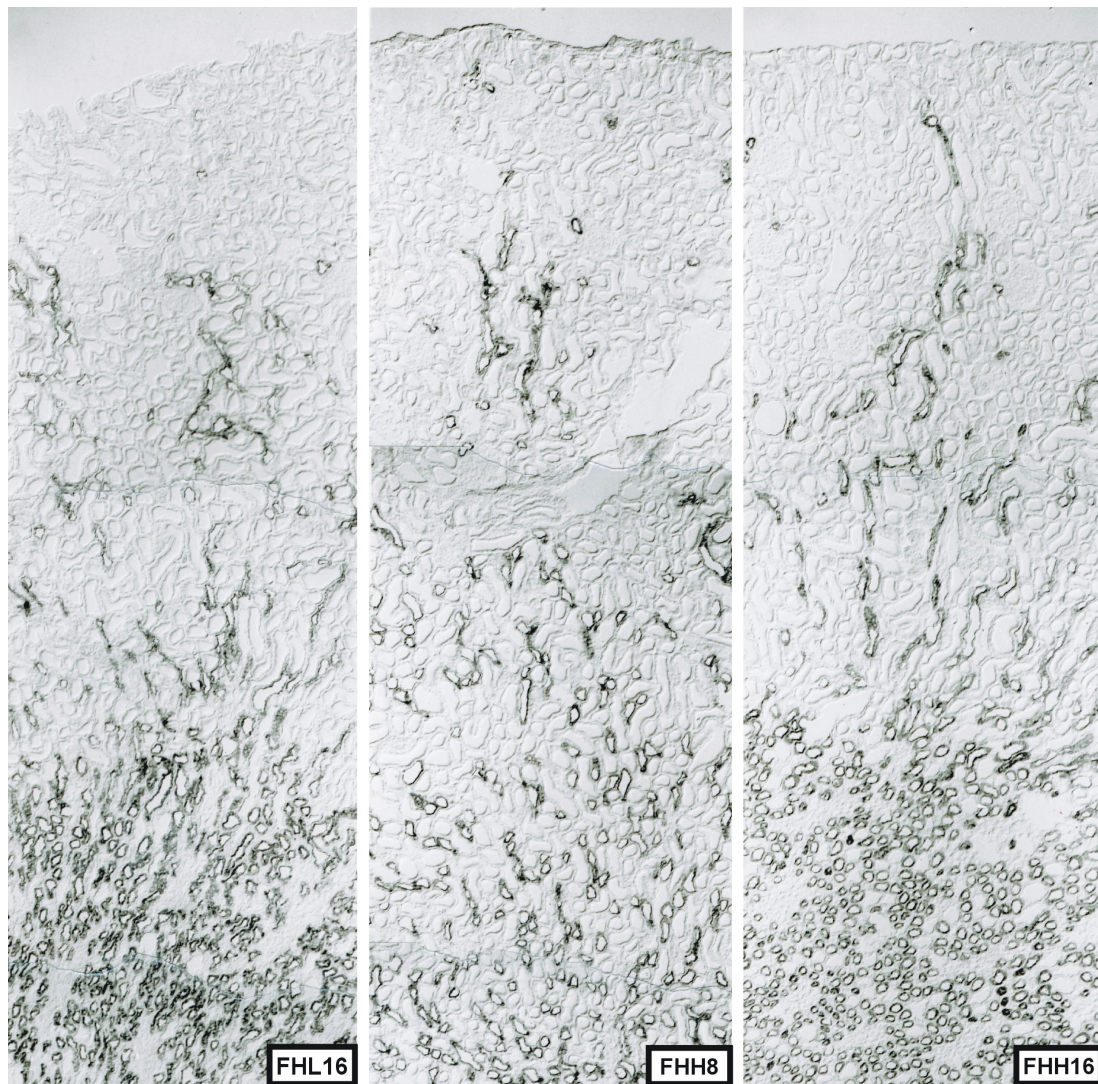


Abbildung 7: Expression des NKCC2 im TAL bei FHL16, FHH8 und FHH16-Ratten. Ebenso wie auf der hier dargestellten Übersichtsvergrößerung waren auch bei genauerem Durchmustern gröbere Abweichungen im Expressionsmuster zwischen den einzelnen Tieren, speziell im Bereich der Macula densa, nicht zu erkennen. Alle Vergrößerungen ungefähr x100.

## 4.5 Renin mRNA und Protein

Expression von Renin mRNA und Renin-Protein ließ sich ausschließlich im Bereich der kleinsten zuführenden Glomerulum-Polgefäße nachweisen (vgl. hierzu Abbildung 8). Die Daten zum Vergleich der Renin-mRNA und Proteinsynthese im Bereich der afferenten Arteriole wurden durch die mikroskopische Auswertung von je 2 Nierenschnitten pro Tier gewonnen (siehe dazu Kapitel 2). Hierbei zeigte sich in den afferenten Arteriolen der FHH8 und FHH16-Tiere ein deutlich dichteres und viel weiter stromaufwärts reichendes Signal im Vergleich zum Signal am Gefäßpol von FHL16-Ratten, welches rein qualitativ dem bei unbehandelten normotensiven Rattenstämmen (z.B. Wistar-Kyoto-rats) gleich, die in anderen Experimenten des Labors Bachmann verwendet wurden. Im einzelnen betrug die Erhöhung der Werte der positiven JGA's pro definierter Schnittfläche für die Renin mRNA-Expression im Vergleich zur FHL16-Kontrollgruppe für die FHH8 Gruppe 51% mit  $p < 0,025$  und für die FHH16-Gruppe +105% mit  $p < 0,025$ . Für die Renin mRNA-Expression fand sich eine Erhöhung der Werte von +166% mit  $p < 0,025$  für FHH8 und von 136% mit  $p < 0,025$  für FHH16 im Vergleich zu den Werten der Kontrollgruppe FHL16.

Tabelle 4: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Renin-mRNA und Proteinsynthese in den einzelnen Versuchsgruppen. Es zeigt sich eine signifikante (\*) Zunahme beider Parameter bei FHH8 und FHH16-Ratten im Vergleich zur FHL16-Kontrollgruppe. Die Werte für FHH8 und FHH16-Ratten wiesen im Vergleich untereinander für beide Parameter keine signifikanten Unterschiede auf.

	Renin-mRNA	Renin-Protein
	<i>in positiven JGA's pro 100 Glomerula</i>	
<b>FHL16 (n=5)</b>	3,13 $\pm$ 0,50	9,39 $\pm$ 3,07
<b>FHH8 (n=4)</b>	8,3 $\pm$ 0,31 *	14,21 $\pm$ 0,40 *
<b>FHH16 (n=4)</b>	7,4 $\pm$ 0,33 *	19,20 $\pm$ 1,74 *



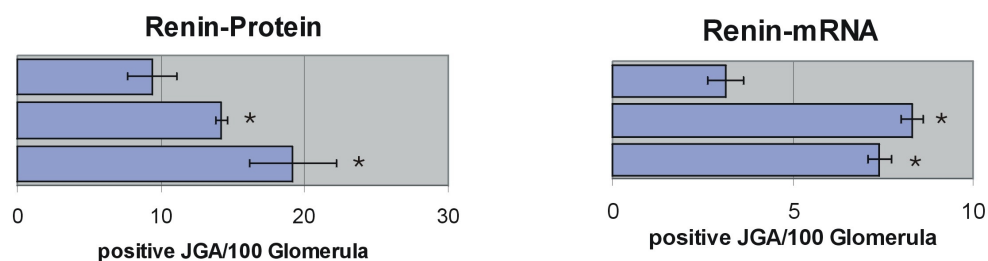
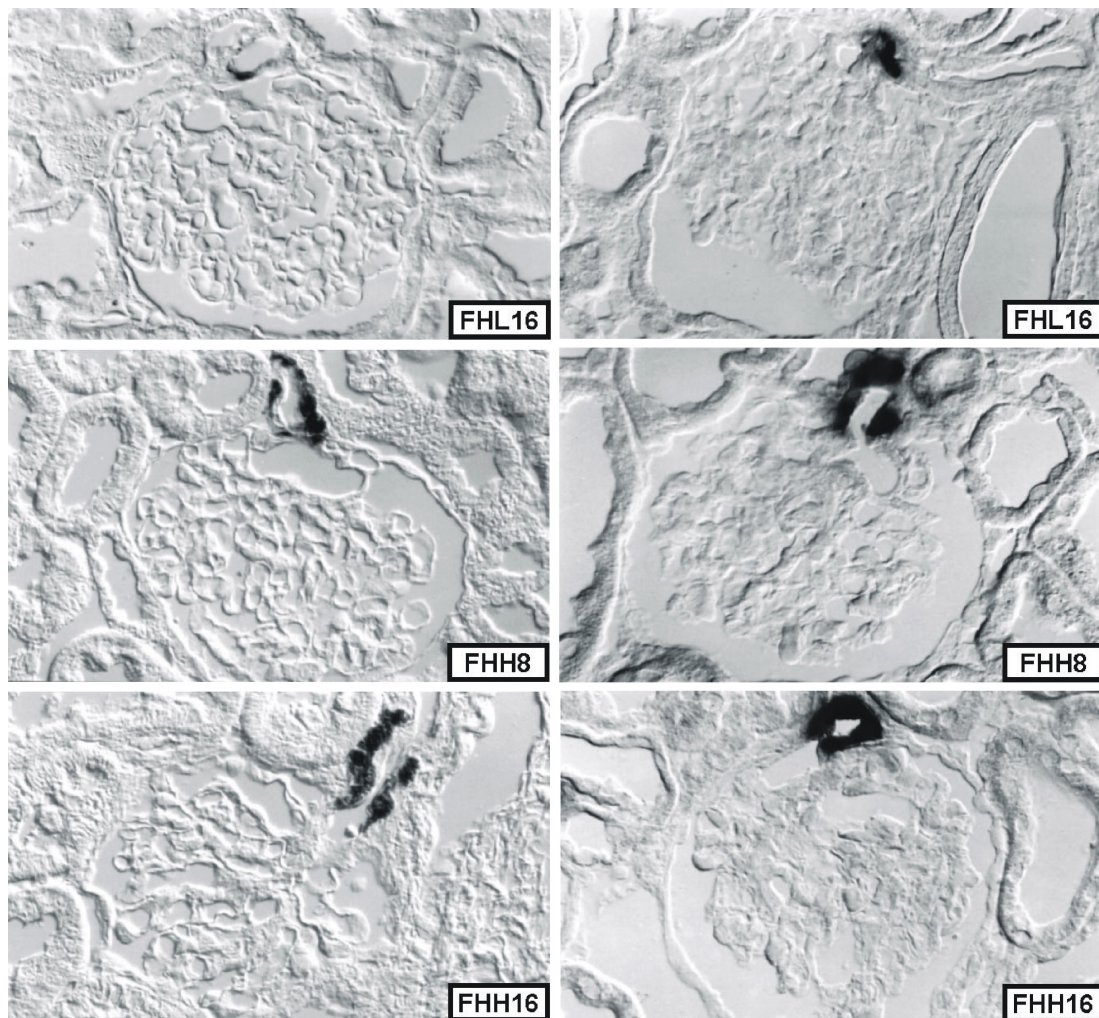


Abbildung 8: Repräsentative Abbildungen der Renin mRNA- (**rechte Spalte**) und Proteinexpression (**linke Spalte**) in der afferenten Arteriole von FHL16-, FHH8- und FHH16-Ratten. Man erkennt die im Vergleich zu FHL16-Ratten deutlich verstärkte Signalintensität und Signalausbreitung bei FHH8- und FHH16-Ratten (siehe Diagramm). Lichtmikroskopie mit Interferenzkontrast. Ungefähre Vergrößerung (alle) x300

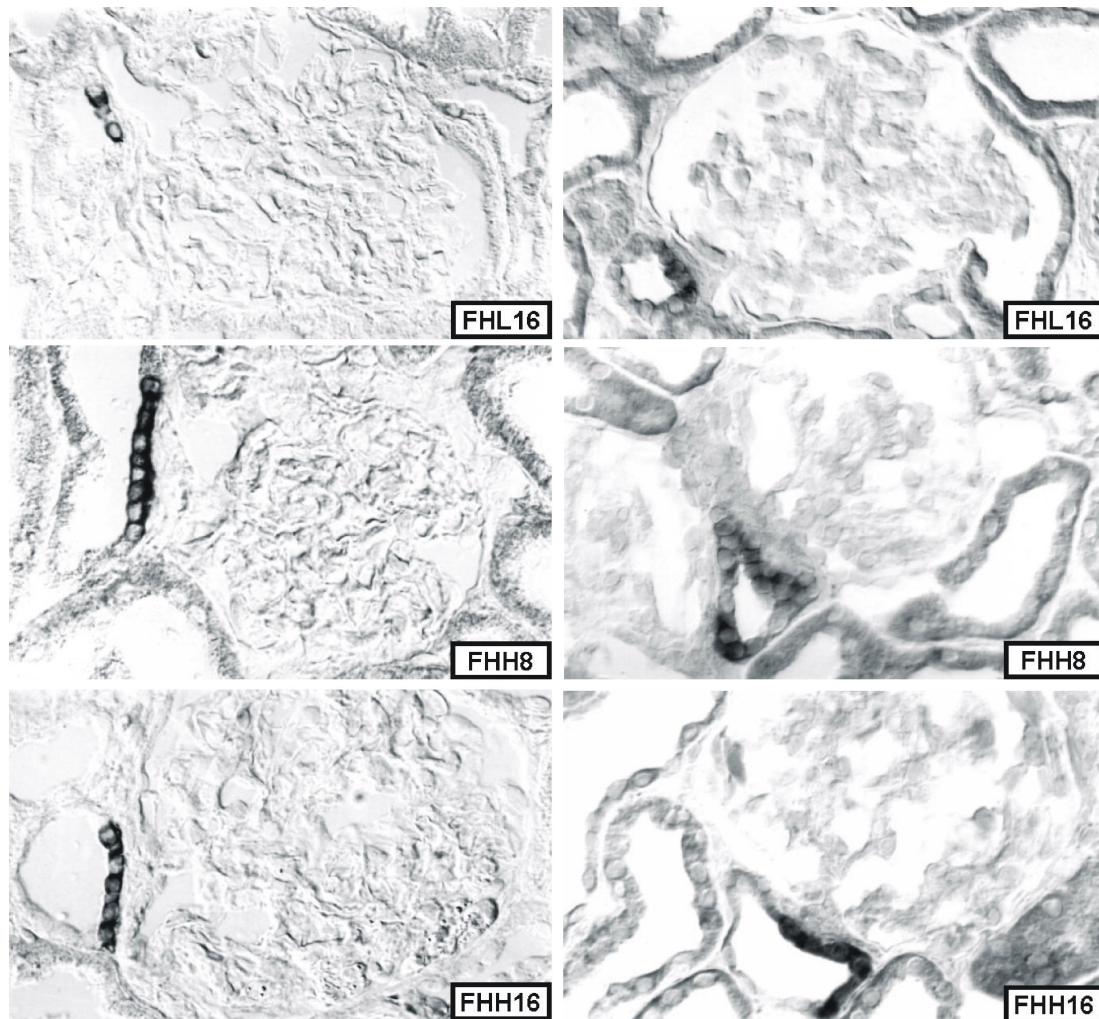


#### 4.6 NOS1-Proteinaktivität und mRNA-Expression

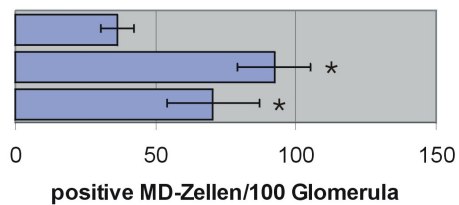
Wie erwartet fand sich das Signal in der Diaphorasereaktion als auch das Signal in der In situ-Hybridisierung zur Detektion von NOS1-mRNA ausschließlich in den Anschnitten von Macula densa-Zellen [Bachmann et al. 1995]. Als Äquivalent zur NOS1-Proteinaktivität erfolgte die Auszählung MD-positiver Zellen in der Diaphorasereaktion auf jeweils 2 Gewebsschnitten pro Tier. Entsprechend dazu wurden die in der In situ-Hybridisierung zur Detektion von NOS1-mRNA signalpositiven MD-Zellen ebenfalls ausgezählt. Aus den jeweiligen Werten und der Anzahl der auf den Schnitten vorhandenen Glomerula wurde sodann ein Index pro Tier gebildet (näheres siehe Kapitel 2). Es zeigte sich für die NOS1-Proteinaktivität eine Erhöhung der Werte für FHH8 Ratten von +153% mit  $p < 0,025$  und für FHH16-Ratten von +93% mit  $p < 0,025$ , verglichen mit den Werten der FHL16-Gruppe. Auch die mRNA-Expression erfuhr einen Anstieg von +88%,  $p < 0,025$  (FHH8) und +98%,  $p < 0,025$  (FHH16) im Vergleich zu den Werten der FHL16-Kontrollen.

Tabelle 5: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen für NOS1-mRNA Expression und NOS I Proteinaktivität, nachgewiesen durch die Diaphorasereaktion der einzelnen Versuchsgruppen. Es fand sich eine signifikante (\*) Erhöhung für beide Parameter im Vergleich der Werte von FHH8 und der FHH16-Ratten mit den Werten der FHL-Gruppe. Die Werte der FHH8 und FHH16-Gruppe untereinander differieren jeweils nicht signifikant.

	NOS1-mRNA	NOS1-Proteinaktivität
	<i>In positiven MD-Zellen pro 100 Glomerula</i>	
<b>FHL16 (n=5)</b>	36,44 $\pm$ 5,86	45,32 $\pm$ 8,48
<b>FHH8 (n=4)</b>	92,27 $\pm$ 13,21 *	85,16 $\pm$ 12,08 *
<b>FHH16 (n=4)</b>	70,45 $\pm$ 16,44 *	89,57 $\pm$ 12,7 *



NADPH-d-Reaktion



NOS I-mRNA

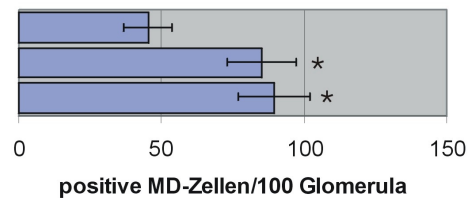


Abbildung 9: Repräsentative Abbildung von Glomerula von FHL16-, FHH8- und FHH16-Ratten mit Darstellung der NADPH-d-Reaktion (**linke Spalte**) und der NOS1 mRNA-Expression (**rechte Spalte**) an der MD. Man beachte die höhere Anzahl von signalpositiven Zellen in der MD von FHH8- und FHH16-Ratten im Vergleich zu FHL-16-Ratten (siehe Diagramm). Lichtmikroskopie mit Interferenzkontrast. Ungefähre Vergrößerung (alle) x300

#### 4.7 Cyclooxygenase 2-Protein

Die Immunreaktivität für COX-2 zeigte ähnlich der Renin-Protein-Immunreaktivität stark erhöhte Werte in der FHH8 und FHH16-Gruppe, verglichen mit den FHL16- Kontrollen. Ähnlich der NOS1-Aktivität und mRNA-Expression wurden jeweils immunomarkierten Zellen gezählt und zur Gesamtzahl der gezählten Glomerula ins Verhältnis gesetzt. Die FHL16-Ratten zeigten ähnlich anderen Rattenstämmen ohne Erkrankungen [Harris et al. 1994] Immunreaktivität für COX-2 in erster Linie im Bereich der an die MD angrenzenden TAL-Zellen, während die eigentlichen MD-Zellen kein Signal aufwiesen. Im Gegensatz dazu fand sich sowohl in der FHH8 als auch in der FHH16-Gruppe zusätzlich ein starkes Signal im Bereich der MD-Zellen selbst. Verglichen mit den Werten der FHL16-Gruppe fanden sich bei Tieren der FHH8-Gruppe um 166% ( $p < 0,025$ ) und bei Tieren der FHH16-Gruppe um 157% ( $p < 0,025$ ) erhöhte Werte. Vor allem Nephrone mit das Tubuluslumen füllenden proteinösen Ausgußzylindern im TAL (inklusive MD) zeigten stark erhöhte Immunreaktivität im Bereich der eigentlichen MD-Zellen und in den an die MD angrenzenden Zellen des TAL.

Tabelle 6: COX-2-Protein-Immunreaktivität der Versuchsgruppen im Vergleich. Signifikant (\*) erhöhte COX-2-Proteinexpression in der FHH16 und der FHH8-Gruppe, bezogen auf die Werte der FHL16-Gruppe. Die Unterschiede zwischen der FHH8 und der FHH16-Gruppe sind nicht signifikant.

COX-2-Protein (in positiven MD-Zellen pro 100 Glomerula)	
FHL16 (n=4)	27,08 ± 6,33
FHH8 (n=4)	71,98 ± 16,74 *
FHH16 (n=4)	69,68 ± 17,98 *

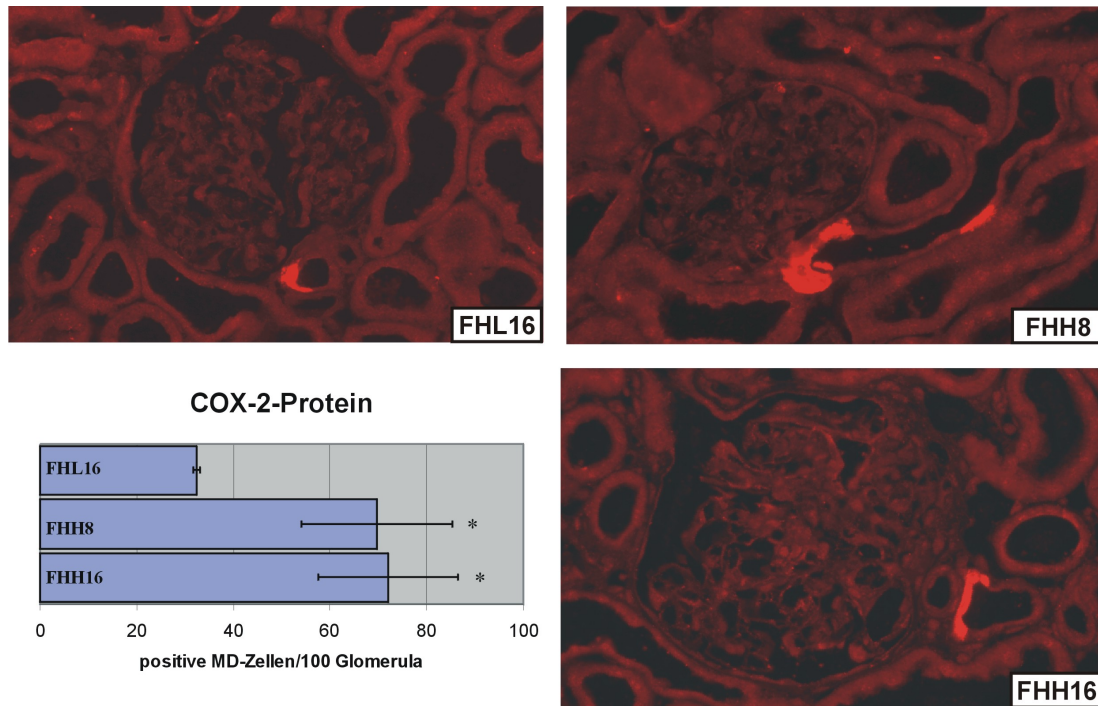


Abbildung 10: Repräsentative Abbildung der Glomerula von FHL16-, FHH8- und FHH16-Ratten. Man erkennt die deutlich gesteigerte Immunreaktivität für COX-2 im Bereich der MD und der angrenzenden TAL-Abschnitte von FHH8- und FHH16-Ratten im Vergleich zu FHL16-Ratten (siehe Diagramm). Immunfluoreszenzmikroskopie. Ungefähre Vergrößerung x250

## 5 Diskussion

### 5.1 Morphologische Schäden

#### 5.1.1 Arteriopathie

Die in dieser Studie beschriebenen lichtmikroskopischen und ultrastrukturellen morphologischen Veränderungen im Bereich des Gefäßbettes von FHH16 entsprechen einer moderaten, hypertensiven Arteriopathie [Olson et al. 1998, Schoen und Cotran 1999]. Hierzu zählt die ausgeprägte Mediahypertrophie, die vor allem im Bereich der Arteriolen sowohl prä- als auch postglomerulär nachweisbar war, die aber ebenfalls, wenn auch in geringerer Ausprägung, in den größeren renalen Arterien vorlag. Zusätzliche myozytäre Degenerationszeichen mit hyalinen Einlagerungen und subendotheliale Schlitzbildungen vervollständigen das Bild der „typischen“ hypertensiven Gefäßveränderungen. Nur sehr vereinzelt nachweisbar waren Veränderungen im Sinne einer klassischen, zwiebelschalartigen, hyperplastischen Arteriopathie. Ältere morphologische Untersuchungen an FH-Ratten berichteten über ähnliche vaskuläre Veränderungen, die allerdings erst in einem späteren Lebensalter der FH-Ratte auftraten [Kuijpers und Gruys 1984, Kuijpers und De Jong 1987]. Grund für die frühere Entwicklung von Schädigungszeichen in dieser Studie mag ein im Vergleich zu den oben angeführten Studien höherer Blutdruck des in dieser Arbeit untersuchten Tierkollektivs sein. FHH8-Ratten wiesen keinerlei ultrastrukturelle und lichtmikroskopische vaskuläre Schädigungszeichen auf, was den Rückschluß erlaubt, dass erste vaskuläre Veränderungen bei der FHH-Ratte zwischen der 8. und der 16. Lebenswoche entstehen und sich mit zunehmendem Lebensalter, analog zu den vaskulären Veränderungen von FH-Ratten, aller Wahrscheinlichkeit nach bis hin zur malignen Nephrosklerose entwickeln [Kuijpers und De Jong 1987]. Ob die Gefäßveränderungen, die in Relation zur eher moderaten Blutdruckerhöhung auffällig früh entstehen, lediglich auf den erhöhten systemischen Druck oder eventuell zusätzlich auf eine angeborene konstitutionelle Schwäche der Gefäße von FHH-Ratten zurückzuführen ist, bleibt zu untersuchen. Denkbar ist diese Möglichkeit insofern, als dass auf funktioneller Ebene Alterationen der myogenen Antwort auf unterschiedliche renale Perfusionsdrücke bekannt sind [van Dokkum et al. 1999]. Auch die Möglichkeit, dass die vorhandene Arteriopathie im Bereich der afferenten Arteriole in Zusammenhang steht mit den Störungen der glomerulären Hämodynamik von FHH-Ratten, bleibt zu klären. Dagegen spricht allerdings die Tatsache, dass auch schon sehr junge FHH-Ratten einen glomerulären Hypertonus aufweisen [Simons et al. 1993], aber keinerlei Schädigungszeichen im Sinne einer Arteriopathie zeigen, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Ein zusätzlich zur funktionellen Grundstörung vorhandener modulierender Effekt der sich zunehmend entwickelnden Gefäßschäden auf die Regulation des Tonus der afferenten Arteriole scheint aber möglich.

#### 5.1.2 Fokal segmentale Glomerulosklerose

Die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse über die qualitative Entwicklung der fokal segmentalen Veränderungen in den Glomerula der FHH-Ratte decken sich im wesentlichen mit den von anderen Autoren gewonnenen Erkenntnissen [Kriz et al 1996, 1998, 1999]. Die Entwicklung der FSGS setzte bei den in dieser Studie untersuchten Ratten zwischen der 8. und der 16. Lebenswoche ein. Im Gegensatz zu Untersuchungen an jungen FH-Ratten fanden sich bei FHH8-Ratten keine klar objektivierbaren morphologischen Veränderungen im Bereich der Glomerula. Die Beobachtung, dass die bei FHH16-Ratten vorliegenden glomerulären Schädigungen intra- und interindividuell sehr unterschiedlich starke Ausprägung zeigten, betont den Aspekt, dass das Vorliegen von funktionellen Dysregulationen am Glomerulum im Einzelfall zu sehr verschiedenen pathomorphologischen Veränderungen führen kann. Ob dies mit Variationen des  $P_{GC}$  der betroffenen Glomerula oder mit einer genetisch determinierten stärkeren Anfälligkeit einzelner Tiere / Glomerula für FSGS zusammenhängt, ist unklar. Eine starke genetische Komponente scheint wahrscheinlich [Brown et al. 1996, 1998]. Eine Präferenz einzelner Regionen (juxtamedullär vs. subkortikal) für die Entwicklung von glomerulären Schädigungen ließ sich wie auch schon in anderen Studien an FH-Ratten [Kuijpers und Gruys 1984, Kuijpers und De Jong 1987] nicht nachweisen. Die starke Variationsbreite der

sklerotischen Veränderungen ließ es zu, dass in einzelnen Tieren die komplette pathomorphologische Sequenz der FSGS verfolgt werden konnte. Die von Kriz und Koautoren in einer Vielzahl von Studien sowohl an FHH-Ratten als auch an anderen Rattenstämmen und menschlichen Nieren beobachteten einzelnen Stadien der FSGS (siehe Kapitel 1.3.7) decken sich exakt mit den hier beschriebenen Veränderungen. So fanden sich völlig intakte Glomerula, sehr gering geschädigte Glomerula mit lediglich leichter Dilatation des Primärastes der afferenten Arteriole neben Glomerula mit typischer segmentaler Sklerose und komplett sklerotisch-fibrotisch umgebaute Glomerula in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander. Insbesondere die von Kriz geäußerte Vermutung, dass die interstitielle, peritubuläre Fibrose bei der FSGS zu einem nicht unerheblichen Teil auf eine Ausdehnung des paraglomerulären „falschen“ Filtrationsraumes entlang der Basalmembran des proximalen Tubulus zurückzuführen ist [Kriz et al 1998, 1999], ließ sich pathomorphologisch an den in dieser Studie untersuchten FHH-Ratten bestätigen. Im Vergleich zu älteren Arbeiten [Kuijpers und De Jong 1987, Verseput et al. 1997, 1998, Kriz et al 1998, Van Dokkum et al. 1998] zeigten die Nieren der in dieser Studie untersuchten FHH16-Ratten sehr ausgeprägte Veränderungen und einen hohen Sklerosescore. Ob die im Vergleich zu Voruntersuchungen in dieser Studie beobachtete verstärkt und verfrüht auftretende Schädigung auf den interindividuell starken Schwankungen bei der Schädigungsentwicklung der Einzeltiere oder auf einer Tendenz zur akzelerierten Entwicklung von FSGS durch fortgesetzte Inzucht der FHH-Ratten beruht, ist nur durch Folgeuntersuchungen zu klären. Allerdings sei auch angemerkt, dass die korrekte Erhebung des Anteiles segmental sklerotischer Glomerula methodisch extrem aufwendig ist und das Anfertigen multipler Serienschnitte verlangt, da bei glomerulären Anschnitten naturgemäß eine Sklerosierung, die nicht in der Ebene des Schnittes liegt, verfehlt wird. So ist unter Bezug auf Studien, die die in einem Anschnitt vorliegenden Sklerosierungen mit der Gesamtzahl tatsächlich sklerotischer Glomerula vergleichen [z.B. Remuzzi et al. 1990], von insgesamt deutlich höheren Skleroseraten auszugehen. Die von uns erhobenen Werte liegen im oberen Bereich der allerdings ebenfalls starken Schwankungen unterworfenen Ergebnisse anderer Autoren [Kuijpers und De Jong 1987, Verseput et al. 1997, 1998, Kriz et al. 1998, van Dokkum et al. 1998], was neben den oben genannten möglichen Gründen in erster Linie auf uneinheitliche Bewertungsscores zurückzuführen sein dürfte.

### 5.1.3 Matrixexpression

Einen weiteren Hinweis für die Vergleichbarkeit von menschlicher FSGS und der FSGS der FHH-Ratte erbrachte die Untersuchung der Veränderungen von Expression und Ablagerung von Matrixkomponenten bei FHH-Ratten mit manifester FSGS. Analog zu Studien, die zur humanen FSGS durchgeführt wurden [Büyükbabani et al. 1994, Cai et al. 1996], ließ sich auch bei der FHH-Ratte nachweisen, dass eine überschießende Synthese und Ablagerung von Kollagen IV in den Sklerosezonen geschädigter Glomerula vorliegt. Bei stärker geschädigten Nephronen erfolgte schließlich auch eine verstärkte Expression von Kollagen IV-mRNA im Epithel des proximalen Tubulus und subepitheliale Einlagerungen von Kollagen IV. Ebenfalls analog zu den erwähnten entsprechenden Untersuchungen an humanen Nieren fand sich keine verstärkte Synthese von Kollagen I, so dass geschlossen werden kann, dass die Induktion der Synthese von Kollagen IV, nicht aber die Synthese von Kollagen I bei der FHH-Ratte als wichtiger Schritt auf dem Weg zur globalen Sklerosierung des Glomerulum angesehen werden kann. Wie es schließlich zu dieser Induktion kommt, ist noch unklar. Denkbar wäre eine durch Druckbelastung/Zugbelastung ausgelöste Veränderung des Expressionsmusters von Matrixproteinen in parietalen Epithelzellen und Mesangiumzellen, ein Mechanismus, für den es Hinweise aus Experimenten an Zellkulturen und aus ultrastrukturellen Studien zum Ablagerungsmuster von Kollagenen gibt [Cai et al. 1996, Mertens et al. 1998, Riser et al. 1999]. Ebenfalls möglich wäre eine Induktion der Kollagen IV-Synthese durch vermehrte Expression von TGF $\beta$  bzw. dessen Rezeptoren. Hinweise hierfür ergaben sich aus Studien, die nachweisen konnten, dass bei einigen Formen der FSGS eine erhöhte Expression von TGF $\beta$ /TGF $\beta$ -Rezeptoren vorlag [Yamamoto et al. 1993, 1996, 1998]. Ebenfalls nachweisen ließ sich eine erhöhte Expression von PDGF in den Glomerula von FSGS-Patienten [Stein-Oakley et al. 1997], PDGF wiederum kann via TGF $\beta$  die Kollagensynthese regulieren. Die Expression von TGF $\beta$  wird durch Angiotensin II induziert [zur Übersicht Wolf 1998]. Diese interessante Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass auch bei der FHH-Ratte die Dysregulation des RAS neben den hämodynamischen Auswirkungen zusätzlich über verstärkte Matrixsynthese und Matrixablagerung verstärkend auf die Entwicklung der Sklerose wirkt. Die in unserem Labor durchgeführten Untersuchungen zur Expression von TGF $\beta$  und PDGF in und um sklerotische Areale der FHH-Ratte

erbrachten mit der nichtradioaktiven In situ-Hybridisierung allerdings noch keine eindeutigen Ergebnisse, so dass weitere Untersuchungen wünschenswert erscheinen.

## **5.2 Hypertonus**

Die in dieser Arbeit nachgewiesene deutliche Erhöhung von Renin mRNA und Reninproteinexpression im Bereich der afferenten Arteriole von FHH-Ratten im Vergleich zu FHL-Ratten läßt die Vermutung zu, dass, obwohl die Plasmapreninwerte nicht bestimmt wurden, bei den von uns untersuchten FHH-Ratten die Aktivierung des RAS eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des systemischen Bluthochdrucks spielt. Diese Erkenntnis steht im Einklang mit Versuchsergebnissen von Jung und Koautoren [1993], die in ähnlichen Altersgruppen von FHH-Ratten signifikante Erhöhungen des Plasmapreninspiegels und intrarenalen Renin mRNA-Level nachweisen konnten. Die betr. des Plasmapreninspiegels konträren Ergebnisse anderer Gruppen [Magro und Rudofsky 1982, Kuipers und De Jong 1987] könnten eventuell darauf zurückzuführen sein, dass die verwendeten Ratten zwar als Ahnen der FHH-Ratte zu betrachten sind, sich aber sowohl physiologisch als auch genetisch in einigen Aspekten von der FHH-Ratte unterscheiden [Provoost et al. 1998]. Die Effektivität von ACE-Hemmern und AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten bei der Kontrolle des Hypertonus der FHH-Ratte kann als weiterer indirekter Hinweis auf eine zentrale Rolle des RAS bei der Entstehung des Hypertonus gewertet werden [Magro et al. 1986, Westenend et al. 1990, Verseput et al. 1998, 2000]. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass das RAS bei der FHH-Ratte scheinbar primär aktiviert vorliegt, im Gegensatz zu den Gegebenheiten in einer Vielzahl experimenteller Ansätze (z.B. im Goldblattmodell, bei Salzbelastung, unter Behandlung mit ACE-Hemmern), in denen die Aktivierung des RAS durch Schaffung von experimentellen Bedingungen „artifizial“ erzeugt werden muß. Eine sekundäre Aktivierung des RAS auf dem Boden der FSGS bei FHH-Ratten scheint nahezu ausgeschlossen, da in dieser Studie nachgewiesen werden konnte, dass die Erhöhung von Renin-mRNA und Protein bei der FHH-Ratte schon in einem Alter vorlag, in dem noch keinerlei renale Schädigungszeichen anzutreffen waren.

## **5.3 Glomeruläre Hämodynamik der FHH-Ratte**

Es besteht weitgehend Konsens unter den an FHH-Ratten arbeitenden Forschungsgruppen, dass die Störung der glomerulären Hämodynamik Grundlage und Motor der Entwicklung der FSGS der FHH-Ratte bildet [Simons et al. 1993, Provoost 1995, Verseput et al. 1998, Kriz et al. 1998]. Der im Vergleich zu FHL-Ratten und zu anderen Rattenstämmen deutlich erniedrigte Tonus der afferenten Arteriole, bei gleichzeitiger Erhöhung des Tonus der efferenten Arteriole [Simons et al. 1993, Verseput et al. 1998], läßt im Kapillarbett des Glomerulum Drücke entstehen, die die architektonischen Gegebenheiten überfordern [Kriz et al. 1998], sobald der systemische Blutdruck nur gering über Normaldruck erhöht vorliegt. Entscheidender Punkt scheint hier vor allem ein Regulationsdefizit im Bereich von afferenter und efferenter Arteriole zu sein [Simons et al. 1993, Verseput et al. 1998]. So entwickeln beispielsweise SHR-Ratten mit systemischen Blutdruckwerten, die weit über den Druckwerten von FHH-Ratten liegen, deutlich langsamere glomeruläre Schädigungen, was darauf zurückgeführt wird, dass die Autoregulation und der TGF im Bereich der afferenten Arteriole der SHR-Ratte bei den anliegenden erhöhten renalen Perfusionsdrücken zu einer massiven Kontraktion im präglomerulären Gefäßbett führt und damit die im Glomerulum anliegenden Drücke auf Normalniveau reduziert [Dworkin und Feiner 1986]. Wodurch allerdings diese bei der FHH-Ratte vorliegende hämodynamische Dysregulation bedingt ist, galt bisher weitestgehend als unbekannt. Die mögliche Ursache einer solchen Dysregulation könnte in einer Störung der autoregulatorisch gesteuerten Kontraktion der präglomerulären Nierenarteriolen auf gesteigerte renale Perfusionsdrücke liegen. Und tatsächlich gibt es Hinweise auf das Vorliegen einer solchen Störung bei der FHH-Ratte [van Dokkum et al. 1999], allerdings darf bezweifelt werden, dass diese Störung, deren Ausprägung auch noch nicht ausreichend untersucht ist, das einzige pathogenetische Prinzip bei der FHH-Ratte darstellt. Vielmehr liegt die Annahme nahe, dass zusätzlich auch Störungen im Bereich des TGF der FHH-Ratte vorhanden sein könnten. Zwar fanden Verseput und Koautoren [1998], dass verglichen mit Kontrollratten die FHH-Ratten über eine normale TGF-Reaktivität verfügen, allerdings sind in diesem Zusammenhang zwei entscheidende Aspekte zu beachten. Zum einen ist der „operating point“, um den herum der TGF bei FHH-Ratten reguliert wird, deutlich nach rechts hin zu einem höheren



mittleren Perfusionsdruck verschoben und zum anderen ist eine „normale“ Regulation bei den Perfusionsdrücken, die am Glomerulum der FHH-Ratte anliegen, als im Verhältnis nicht ausreichend zu betrachten. Der Nachweis einer Erhöhung der COX-2 und NOS1 Expression in dieser Studie kann als mögliche Ursache dieser Dysregulationen in Betracht gezogen werden. Neben der in dieser Arbeit nachgewiesenen erhöhten Expression von COX-2 konnte auch gezeigt werden, dass die Konzentrationen von Prostaglandinen (unter anderem von Prostaglandin E<sub>2</sub>) im Urin von FH-Ratten verglichen mit Kontrolltieren erhöht sind [de Keijzer et al. 1992]. Es ist bekannt, dass sowohl die von der COX-2 gebildeten Prostaglandine als auch durch NOS1 gebildetes NO in der Lage sind die TGF-vermittelte Kontraktion der afferenten Arteriole abzuschwächen [Ichihara et al. 1998, 1999, Welch et al. 1999], wobei die Möglichkeit besteht, dass dieser Mechanismus im Falle des NO ebenfalls über die COX-2 vermittelt wird [Ichihara et al. 1998]. Des weiteren belegen Studien, dass NO in der Lage ist den „operating-point“ des TGF nach rechts zu verschieben [Übersicht in Wilcox 1998, Welch et al. 1999]. Aus diesen Informationen ist ersichtlich, dass eine Aktivierung beider Signalsysteme, wie wir sie in der hier vorliegenden Arbeit nachweisen konnten, für die Dysregulation des Tonus der afferenten Arteriole verantwortlich sein können und damit möglicherweise erheblichen Anteil an der Entstehung des glomerulären Hypertonus und konsequenterweise der FSGS der FHH-Ratte haben. Für den erhöhten Tonus im Bereich der efferenten Arteriole wiederum können NO und Prostaglandine keine Rolle spielen. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen bietet die Beobachtung, dass Angiotensin II unter anderem als potenter Vasokonstriktor an der efferenten Arteriole wirkt [Arendshorst et al. 1999]. Bei einer starken Aktivierung des RAS, wie es im Fall der FHH-Ratte vorliegt, ist folglich auch von hohen lokalen und systemischen Angiotensin II-Spiegeln auszugehen, was eine Tonisierung der efferenten Arteriole begünstigt. Der ebenfalls konstringierende Effekt von Angiotensin II auf die afferente Arteriole wiederum wird bei der FHH-Ratte eventuell durch den antagonisierenden Effekt von NO und Prostaglandinen maskiert. Gestützt wird diese Vermutung durch eine Studie von Jung und Koautoren, die lokal zwar keine erhöhte Expression für Angiotensinogen und ACE-mRNA wohl aber für AT<sub>1</sub>-Rezeptor-mRNA in der Niere von FHH-Ratten nachweisen konnten [Jung et al. 1995].

#### 5.4 Das RAS der FHH-Ratte

Auch die zweite Hauptfunktion des JGA, nämlich die Kontrolle von Reninsynthese und Sekretion, weist bei der FHH-Ratte Alterationen auf. So ließ sich in dieser Arbeit eine erhöhte Expression von Renin-mRNA und Protein nachweisen, mit ausgeprägter metaplastischer Transformation glattmuskulärer Muskelzellen der afferenten Arteriole zu granulierten Renin-synthetisierenden Zellen und damit einer absoluten Zunahme der Anzahl von Renin-synthetisierenden Zellen. Des weiteren zeigten die granulierten Zellen ultrastrukturell eine Anhäufung von Reningranula, die in dieser Form bei FHL-Ratten nicht beobachtet werden konnten. Insgesamt entspricht dieses Expressionsmuster den Befunden in anderen Tiermodellen mit massiv aktiviertem RAS [Bosse et al. 1995]. Da in einer Reihe dieser Modelle die MD-Expression von NO und Prostaglandinen für die Aktivierung des RAS verantwortlich gemacht wurde bzw. sich durch Hemmung der MD-assoziierten Enzyme NOS1 und COX-2 die Aktivierung verhindern ließ [Übersicht in Schnermann 1998], konzentrierten wir uns ebenfalls auf diese beiden Enzymsysteme. So konnten wir nachweisen, dass es bei der FHH-Ratte neben einem aktivierten RAS zu einer parallelen Erhöhung von NOS1 und COX-2-Expression kommt. Diese Befunde entsprechen den Befunden an Ratten unter Salzrestriktion und am Goldblattmodell für Hypertonus [Harris et al. 1994, 2000, Bosse et al. 1995, Schricker et al. 1996]. Die Vermutung, dass die Aktivierung des RAS bei der FHH-Ratte folglich auf eine Erhöhung der Synthese von NO und Prostaglandinen zurückzuführen ist, liegt nahe. NO wäre in der Lage, über eine Aktivierung der sGC, deren Anwesenheit im extraglomerulären und intraglomerulären Mesangium vor kurzem nachgewiesen wurde [Bachmann et al. 2000], die cGMP-Spiegel zu erhöhen, was wiederum in den granulierten Zellen zu einer Inhibition der cAMP-PDE3 führen könnte. Folglich käme es zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel und zu einer Stimulation von Reninsynthese und Sekretion [Übersicht in Kurtz und Wagner 1998]. Des weiteren wäre eine verstärkte NO-Bildung in der MD in der Lage, via Erhöhung der cGMP-Spiegel zu einer verstärkten Expression der MD-COX-2 zu führen [Cheng et al. 2000] und zusätzlich via aus NO gebildeten Peroxynitriden zu einer Aktivierung der COX-2 zu führen [Landino et al. 1996]. Die von der aktivierten COX-2 gebildeten Prostaglandine, am JGA vor allem Prostaglandin E<sub>2</sub>, könnten durch Interaktion mit dem EP<sub>2</sub> oder EP<sub>4</sub>-Rezeptor [Breyer und Breyer 2000] zu einer Erhöhung der cAMP-Spiegel in den granulierten Zellen und folglich zu einer verstärkten Reninsynthese und Sekretion kommen. Passend zu dieser Theorie fand sich eine erhöhte



Ausscheidung von Prostaglandinen (vor allem Prostaglandin  $E_2$ ) im Urin von FH-Ratten [de Keijzer et al. 1992]. Es sei aber erwähnt, dass die hier vorgeschlagenen Zusammenhänge zwar durch eine Reihe von Versuchsergebnissen gestützt werden, die geschilderten Zusammenhänge können letztlich aber nicht als experimentell erwiesen angesehen werden. Hierzu wären weitere Studien an FHH-Ratten unter Verwendung von spezifischen Inhibitoren für NOS1, COX-2, sGC und EP-Rezeptorantagonisten notwendig.

## **5.5 Regulation von MD NOS1 und COX-2 bei der FHH-Ratte**

Es bleibt allerdings die Frage, warum es bei der FHH-Ratte überhaupt zu einer Überexpression von NOS1 und COX-2 kommt. Für COX-2 ist eine Regulation via NO, gebildet durch die MD-NOS1, wahrscheinlich [Cheng et al. 2000, Harris et al. 2000]. Somit würde die beobachtete erhöhte NOS1-Expression eventuell auch für die Erhöhung der COX-2-Expression verantwortlich zeichnen. Warum allerdings die negative Feedbackkontrolle der COX-2 durch Angiotensin II [Cheng et al. 1999] bei der FHH-Ratte, die bei erhöhter PRA folglich auch erhöhte Angiotensin II-Spiegel aufweisen müsste, nicht greift, ist unbekannt. Dieser Aspekt verwundert umso mehr, als dass diese Kontrolle offensichtlich über  $AT_1$ -Rezeptoren vermittelt wird, Jung und Koautoren [1995] aber statt einer vermuteten verminderten Expression des  $AT_1$ -Rezeptors bei der FHH-Ratte eine Erhöhung der  $AT_1$ -Rezeptor-mRNA am JGA nachweisen konnten. Allerdings gibt es Hinweise auf eine stimulierende Wirkung von Angiotensin II auf die NOS1 [Kurtz und Wagner 1998]. Dieser Effekt könnte demnach zu einer Stimulierung des NOS1-COX-2-Regelkreises führen, was zu einer Maskierung des hemmenden Effekts von Angiotensin II auf die Prostaglandinsynthese führen könnte. Einer Veränderung in der Expression von NKCC2, dem für den Salztransport an der MD entscheidenden Transporter, scheint bei der gestörten Regulation von COX-2 und NOS1 bei der FHH-Ratte keine entscheidende Rolle zuzukommen, da zum einen in der Literatur keinerlei Hinweise auf einen solchen Regulationsmechanismus vorliegen, zum anderen die in dieser Arbeit durchgeführte orientierende Untersuchung der Expression von NKCC2 keine Unterschiede bei FHH- und FHL-Ratten nachwies. Zum sicheren Ausschluß einer solchen Regulation wären allerdings weiterführende quantitative Analysen von NKCC2-mRNA und Proteinexpression an der MD von FHH-Ratten erforderlich.

## 5.6 Genetik

Entscheidende Bedeutung für die Entwicklung der FSGS scheint auch der Genetik der FHH-Ratte zuzukommen [Brown et al 1996, 1998]. Hierfür spricht, dass durch Transplantationen von FHH-Nieren in normotensive Ratten diese eine FSGS entwickeln, sobald ihr Blutdruck angehoben wird (Kouwenhoven et al. 1999). Eine Reihe von Genen sind identifiziert, die einen Einfluß auf Blutdruckerhöhung und renaler Schädigung bei der FHH-Ratte ausüben (siehe Kapitel 1.3.11). Wofür die entsprechenden Genbereiche kodieren, ist allerdings unbekannt. Eine Relation zu den beobachteten Veränderungen am juxtaglomerulären Apparat ist nicht bekannt. Die Genloci für Renin (Chromosom 13q13) und NOS1 (12q16) bei der Ratte sind bekannt und liegen nicht im Bereich der entsprechenden *Rf* und *Bpfh* Gene. Lediglich der Genlocus für COX-2 bei der Ratte, der vermutlich auf Chromosom 1 liegt, dessen genaue Lokalisation aber noch nicht bekannt ist, käme für eine genetische Dysregulation in Frage, da auch die entscheidenden *Rf-1* und *Rf-2* ebenso wie der *Bpfh-1* Locus auf Chromosom 1 nachgewiesen wurden. Eine Verbindung erscheint aber unwahrscheinlich (persönliche Kommunikation mit Prof. Provoost). Ob und wie die Produkte der entsprechenden Gene eventuell in die Regulationsmechanismen am JGA der FHH-Ratte eingreifen, wird sich erst klären lassen, sobald bekannt ist, wofür diese Gene kodieren. Bei an FSGS erkrankten Menschen ließen sich keine Zusammenhänge mit Alterationen der zu den Loci *Rf-1* und *Rf-2* homologen Regionen im menschlichen Genom nachweisen [Yu et al. 1999].

## 5.7 Mögliche Zusammenhänge mit menschlicher FSGS

Die frappante Ähnlichkeit des histomorphologischen Entstehungsmechanismus der FSGS bei Menschen mit den an Tiermodellen (hierunter nicht zuletzt die FHH-Ratte) beschriebenen Mechanismen [Kriz et al 1998] legt nahe, dass auch im Hinblick auf die Pathophysiologie der Erkrankung mögliche Parallelen von Bedeutung sein könnten. Zu den primär auf Veränderungen der Hämodynamik beruhenden Formen menschlicher FSGS zählen beispielsweise die hypertensive FSGS und die mit Diabetes Mellitus assoziierte FSGS neben all jenen Formen der FSGS, die auf einem Verlust von funktionsfähigem renalen Parenchym beruhen. Bei diesen Formen, die einen nicht unerheblichen Anteil an der Gesamtzahl der FSGS-Erkrankungen stellen, sind Alterationen der glomerulären Hämodynamik beschrieben, die den in der FHH-Ratte beschriebenen Veränderungen gleichen. Aber auch bei den primär „idiopathischen“ Fällen spielen sekundäre Veränderungen der systemischen und glomerulären Hämodynamik eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der deletären Auswirkungen auf die renale Architektur und Funktion [zur Übersicht D'Agati 1994]. Die Ursachen dieser funktionellen Dysregulationen sind nicht bekannt. So läßt sich spekulieren, dass auch beim Menschen primäre oder sekundäre Dysregulationen im Bereich der NO-Prostaglandin-Renin-Achse möglicherweise zur Entwicklung des glomerulären Hypertonus beitragen. Für diese Theorie sprechen einige indirekte Hinweise. So zeigte sich, dass die Behandlung der FSGS mit ACE-Hemmern bei nahezu allen FSGS-Formen eine deutliche Prognosebesserung bewirkte [Übersicht in Korbet 1998]. Es konnte gezeigt werden, dass der positive Effekt einer solchen Behandlung nicht ausschließlich auf einer adäquaten systemischen Blutdruckkontrolle beruhte, da andere Antihypertensiva zwar eine vergleichbar gute Kontrolle des Blutdrucks bewirkten, sie aber dennoch den Verlauf der Erkrankung nur unzureichend aufzuhalten vermochten. Interessant ist auch die Tatsache, dass die einzige wirksame Behandlungsmöglichkeit der FSGS in dem Verabreichen von Glukokortikoiden besteht. Dieser Effekt wird mit dem entzündungshemmenden Effekt der Glukokortikoide erklärt. Es ist allerdings auch bekannt, dass Glukokortikoide potente Hemmer der COX darstellen. Insofern wäre es denkbar, dass die Verabreichung von Glukokortikoiden über eine Hemmung der MD-COX-2 sowohl die Reninsyntheserate drückt als auch zu einer effektiveren TGF-Kontrolle des Tonus der afferenten Arteriole beiträgt. Zur Erhellung dieser Fragen wären weiterführende Untersuchungen zum Expressionsmuster der entsprechenden Enzyme an menschlichen FSGS-Geweben wünschenswert.

## 6 Zusammenfassung

Die fokal segmentale Glomerulosklerose ist eine der häufigsten Ursachen für adultes und kindliches terminales Nierenversagen weltweit. Die Ätiologie dieser Erkrankung gilt als weitestgehend unbekannt. Ein besonders gutes Tiermodell zum Studium vieler Aspekte der Pathogenese der Erkrankung stellt die hypertensive „fawn-hooded“ Ratte (FHH) dar, die schon in jungen Jahren eine ausgeprägte, teils genetisch bedingte, fokal segmentale Glomerulosklerose ausbildet. Ursächlich liegt der Erkrankung ein glomerulärer Hypertonus zugrunde. In dieser Arbeit wurde die Pathomorphologie der Erkrankung bei 8 und 16 Wochen alten männlichen hypertensiven FHH-Ratten untersucht und die Zusammensetzung der Matrix in den sklerotischen Läsionen näher charakterisiert. Weiterhin wurden parakrin und endokrin wirksame Steuerungsfaktoren am juxtaglomerulären Apparat, der eine entscheidende Rolle bei der Regulation der glomerulären Hämodynamik spielt, einer vergleichenden Analyse unterzogen, um mögliche Ursachen für den glomerulären Hypertonus zu ergründen. Als Kontrollen wurden genetisch verwandte fawn-hooded Ratten mit lediglich leicht erhöhtem Blutdruck (FHL) verwendet, die keine fokal-segmentale Glomerulosklerose entwickeln und keinen glomerulären Hypertonus aufweisen. Es zeigte sich, dass 16 Wochen alte FHH-Ratten eine manifeste Glomerulosklerose und eine moderate Arteriopathie entwickelten, während 8 Wochen alte FHH-Ratten noch keinerlei renale Schädigung erkennen ließen. Analog zu Befunden bei humaner FSGS wurde nachgewiesen, dass die sklerotischen Läsionen der FHH-Ratte eine Überproduktion und Einlagerung von Kollagen IV, nicht aber von Kollagen I aufwiesen. Am juxtaglomerulären Apparat von FHH8- und FHH16-Ratten fand sich, verglichen mit FHL-Ratten eine parallele Überexpression von NOS1 und COX-2 in und um die Macula densa neben einer signifikant erhöhten Reninexpression in der afferenten Arteriole. Diese Beobachtung stützen funktionelle Befunde, die einen stimulierenden Einfluß von NO und Prostaglandinen, vor allem Prostaglandin E<sub>2</sub>, auf die Reninsynthese und Sekretion gezeigt haben. Es erscheint somit plausibel die vermehrte Synthese von NOS1 und COX-2 in der Macula densa der FHH-Ratte in funktionellem Zusammenhang sowohl mit der bei FHH-Ratten vorliegenden Dystonie im Bereich der präglomerulären Arteriolen als auch mit der gesteigerten Reninsynthese und Sekretion zu sehen. Die Frage, ob es sich bei der Stimulation von NOS1 und COX-2 um eine primär genetische Dysregulation handelt oder ob ein bisher noch unbekannter Trigger zu diesen Veränderungen führt, bleibt zunächst unbeantwortet. Da die Veränderungen am JGA aber vor dem Vorhandensein von pathomorphologischen Veränderungen auftreten, ist eine sekundäre, durch die arterioläre und glomeruläre Schädigung bedingte Genese der Veränderungen am JGA unwahrscheinlich. Die Frage, ob möglicherweise ähnliche Dysregulationen am JGA auch zur Pathogenese von Formen der humanen FSGS beitragen, bliebe zu klären.

## Literaturverzeichnis

- 1 Abe T, Takeuchi K, Takahashi N, Tsutsumi E, Taniyama Y, Abe K. Rat kidney thromboxane receptor: molecular cloning, signal transduction, and intrarenal expression localization. *J Clin Invest.* 1995;96(2):657-64
- 2 Altemus M, Smith MA, Diep V, Aulakh CS, Murphy DL. Increased mRNA for corticotrophin releasing hormone in the amygdala of fawn-hooded rats: a potential animal model of anxiety. *Anxiety.* 1994-95;1(6):251-7
- 3 Aulakh CS, Hill JL, Murphy DL. A comparison of feeding and locomotion responses to serotonin agonists in three rat strains. *Pharmacol Biochem Behav.* 1988;31(3):567-71
- 4 Bachmann S, Bosse HM, Mundel P. Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. *Am J Physiol.* 1995;268(5 Pt 2):F885-98
- 5 Bachmann S, Mundel P. Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function. *Am J Kidney Dis.* 1994;24(1):112-29
- 6 Bachmann S, Theilig F, Pavenstädt H, Holland G, Slosarek I, Koesling D. Nitric oxide signalling in kidney and liver: distribution and function of soluble guanylyl cyclase (sGC) b1 subunit. *FASEB J.* 2000;14:A139-A140
- 7 Badishtov BA, Overstreet DH, Kashevskaya OP, Viglinskaya IV, Kampov-Polevoy AB, Seredenin SB, Halikas JA. To drink or not to drink: open field behavior in alcohol-preferring and nonpreferring rat strains. *Physiol Behav.* 1995;57(3):585-9
- 8 Bakir AA, Bazilinski NG, Rhee HL, Ainis H, Dunea G. Focal segmental glomerulosclerosis. A common entity in nephrotic black adults. *Arch Intern Med.* 1989;149(8):1802-4
- 9 Barajas L. Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol.* 1979;237(5):F333-43
- 10 Barajas L. Cell-specific protein and gene expression in the juxtaglomerular apparatus. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1997;24(7):520-6
- 11 Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev.* 1995;75(4):725-48
- 12 Beierwaltes WH, Carretero OA. Nonprostanoid endothelium-derived factors inhibit renin release. *Hypertension.* 1992;19(2 Suppl):II68-73
- 13 Beierwaltes WH. Macula densa stimulation of renin is reversed by selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase. *Am J Physiol.* 1997;272(5 Pt 2):R1359-64
- 14 Beierwaltes WH. Selective neuronal nitric oxide synthase inhibition blocks furosemide-stimulated renin secretion in vivo. *Am J Physiol.* 1995;269(1 Pt 2):F134-9
- 15 Bosse HM, Bohm R, Resch S, Bachmann S. Parallel regulation of constitutive NO synthase and renin at JGA of rat kidney under various stimuli. *Am J Physiol.* 1995;269(6 Pt 2):F793-805
- 16 Braam B, Koomans HA. Nitric oxide antagonizes the actions of angiotensin II to enhance tubuloglomerular feedback responsiveness. *Kidney Int.* 1995;48(5):1406-11
- 17 Braam B, Koomans HA. Reabsorption of nitro-L-arginine infused into the late proximal tubule participates in modulation of TGF responsiveness. *Kidney Int.* 1995;47(5):1252-7

- 18 Brenner BM. Nephron adaptation to renal injury or ablation. *Am J Physiol.* 1985;249(3 Pt 2):F324-37
- 19 Breyer MD, Breyer RM. Prostaglandin E receptors and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;279(1):F12-23
- 20 Breyer MD, Davis L, Jacobson HR, Breyer RM. Differential localization of prostaglandin E receptor subtypes in human kidney. *J Physiol.* 1996;270(5 Pt 2):F912-8
- 21 Breyer MD, Jacobson HR, Davis LS, Breyer RM. In situ hybridization and localization of mRNA for the rabbit prostaglandin EP3 receptor. *Kidney Int.* 1993;44(6):1372-8
- 22 Briggs JP, Schubert G, Schnermann J. Quantitative characterization of the tubuloglomerular feedback response: effect of growth. *Am J Physiol.* 1984;247(5 Pt 2):F808-15
- 23 Brown DM, Provoost AP, Daly MJ, Lander ES, Jacob HJ. Renal disease susceptibility and hypertension are under independent genetic control in the fawn-hooded rat. *Nat Genet.* 1996;12(1):44-51
- 24 Brown DM, Van Dokkum RP, Korte MR, McLaughlin MG, Shiozawa M, Jacob HJ, Provoost AP. Genetic control of susceptibility for renal damage in hypertensive fawn-hooded rats. *Ren Fail.* 1998;20(2):407-11
- 25 Cameron JS. The enigma of focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int Suppl.* 1996;57:S119-31
- 26 Chao AC, de Sauvage FJ, Dong YJ, Wagner JA, Goeddel DV, Gardner P. Activation of intestinal CFTR Cl<sup>-</sup> channel by heat-stable enterotoxin and guanylin via cAMP-dependent protein kinase. *EMBO J.* 1994;13(5):1065-72
- 27 Chen M, Schnermann J, Malvin RL, Killen PD, Briggs JP. Time course of stimulation of renal renin messenger RNA by furosemide. *Hypertension.* 1993;21(1):36-41
- 28 Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, McKanna JA, Harris RC. Nitric oxide regulates renal cortical cyclooxygenase-2 expression. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;279(1):F122-9
- 29 Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, Miyazaki Y, Ichikawa I, McKanna JA, Harris RC. Angiotensin II attenuates renal cortical cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest.* 1999;103(7):953-61
- 30 Chiu T, Reid IA. Role of cyclic GMP-inhibitable phosphodiesterase and nitric oxide in the beta adrenoceptor control of renin secretion. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996;278(2):793-9
- 31 Churg J, Habib R, Whit RHR. Pathology of the nephrotic syndrome of childhood. A report for the International Study of Kidney Disease in children. *Lancet* 1970; *i*:1299-1302
- 32 Cohen AH. HIV-associated nephropathy: current concepts. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13(3):540-2
- 33 D'Agati V. The many masks of focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 1994;46(4):1223-41
- 34 Dantal J, Bigot E, Bogers W, Testa A, Kriaa F, Jacques Y, Hurault de Ligny B, Niaudet P, Charpentier B, Souillou JP. Effect of plasma protein adsorption on protein excretion in kidney-transplant recipients with recurrent nephrotic syndrome. *N Engl J Med.* 1994;330(1):7-14
- 35 Daoust M, Compagnon P, Legrand E, Boucly P. Ethanol intake and 3H-serotonin uptake I: A study in Fawn-Hooded rats. *Life Sci.* 1991;48(20):1969-76
- 36 De Keijzer MH, Provoost AP, Zijlstra FJ. Enhanced urinary excretion of eicosanoids in fawn-hooded rats. *Nephron.* 1992;62(4):454-8
- 37 De Keijzer MH, Provoost AP. Effects of dietary protein on the progression of renal failure in the Fawn-Hooded rat. *Nephron.* 1990;55(2):203-9
- 38 Della Bruna R, Kurtz A, Schriker K. Regulation of renin synthesis in the juxtaglomerular cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1996;5(1):16-9

- 39 Della Bruna R, Pinet F, Corvol P, Kurtz A. Opposite regulation of renin gene expression by cyclic AMP and calcium in isolated mouse juxtaglomerular cells. *Kidney Int.* 1995;47(5):1266-73
- 40 Deng X, Welch WJ, Wilcox CS. Renal vasoconstriction during inhibition of NO synthase: effects of dietary salt. *Kidney Int.* 1994;46(3):639-46
- 41 Dickie P, Felser J, Eckhaus M, Bryant J, Silver J, Marinos N, Notkins AL. HIV-associated nephropathy in transgenic mice expressing HIV-1 genes. *Virology.* 1991;185(1):109-19
- 42 Dworkin LD, Feiner HD. Glomerular injury in uninephrectomized spontaneously hypertensive rats. A consequence of glomerular capillary hypertension. *J Clin Invest.* 1986;77:797-809
- 43 Felldin M, Norden G, Svalander C, Nyberg G. Focal segmental glomerulosclerosis in a kidney transplant population: hereditary and sporadic forms. *Transpl Int.* 1998;11(1):16-21
- 44 Forte LR, Thorne PK, Eber SL, Krause WJ, Freeman RH, Francis SH, Corbin JD. Stimulation of intestinal Cl<sup>-</sup> transport by heat-stable enterotoxin: activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol.* 1992;263(3 Pt 1):C607-15
- 45 Gardes J, Poux JM, Gonzalez MF, Alhenc-Gelas F, Menard J. Decreased renin release and constant kallikrein secretion after injection of L-NAME in isolated perfused rat kidney. *Life Sci.* 1992;50(14):987-93
- 46 Gawaz MP, Bogner C, Gurland HJ. Flow-cytometric analysis of mepacrine-labelled platelets in patients with end-stage renal failure. *Haemostasis.* 1993;23(5):284-92
- 47 Gerber JG, Nies AS, Olsen RD. Control of canine renin release: Macula densa requires prostaglandin synthesis. *J Physiol.* 1981;319:419-29
- 48 Gilboa N, Rudofsky U, Magro A. Urinary and renal kallikrein in hypertensive fawn-hooded (FH/Wjd) rats. *Lab Invest.* 1984;50(1):72-8
- 49 Goyer M, Bui H, Chou L, Evans J, Keil LC, Reid IA. Effect of inhibition of nitric oxide synthesis on vasopressin secretion in conscious rabbits. *Am J Physiol.* 1994;266(2 Pt 2):H822-8
- 50 Greenberg SG, He XR, Schnermann JB, Briggs JP. Effect of nitric oxide on renin secretion. I. Studies in isolated juxtaglomerular granular cells. *Am J Physiol.* 1995;268(5 Pt 2):F948-52
- 51 Greenberg SG, Lorenz JN, He XR, Schnermann JB, Briggs JP. Effect of prostaglandin synthesis inhibition on Macula densa-stimulated renin secretion. *Am J Physiol.* 1993;265(4 Pt 2):F578-83
- 52 Guan Y, Chang M, Cho W, Zhang Y, Redha R, Davis L, Chang S, DuBois RN, Hao CM, Breyer M. Cloning, expression, and regulation of rabbit cyclooxygenase-2 in renal medullary interstitial cells. *Am J Physiol.* 1997;273(1 Pt 2):F18-26
- 53 Haas M, Spargo BH, Coventry S. Increasing incidence of focal-segmental glomerulosclerosis among adult nephropathies: a 20-year renal biopsy study. *Am J Kidney Dis.* 1995;26(5):740-50
- 54 Habib A, Bernard C, Lebreton M, Creminon C, Esposito B, Tedgui A, Macclouf J. Regulation of the expression of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in rat peritoneal macrophages. *J Immunol.* 1997;158(8):3845-51

- 55 Hackenthal E, Münter K, Fritsch S. Role of nitric oxide in the control of renin release from normal and hydronephrotic rat kidney. *Endothelium* 1994; 2:229-237
- 56 Harding P, Sigmon DH, Alfie ME, Huang PL, Fishman MC, Beierwaltes WH, Carretero OA. Cyclooxygenase-2 mediates increased renal renin content induced by low-sodium diet. *Hypertension*. 1997;29(1 Pt 2):297-302
- 57 Harris RC, Cheng H, Wang J, Zhang M, McKanna JA. Interactions of the renin-angiotensin system and neuronal nitric oxide synthase in regulation of cyclooxygenase-2 in the Macula densa. *Acta Physiol Scand*. 2000;168(1):47-51
- 58 Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD. Cyclooxygenase-2 is associated with the Macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *Clin Invest*. 1994;94(6):2504-10
- 59 Harris RC, Wang JL, Cheng HF, Zhang MZ, McKanna JA. Prostaglandins in Macula densa function. *Kidney Int Suppl*. 1998;67:S49-52
- 60 Haynes WG, Hand MF, Dockrell ME, Eadington DW, Lee MR, Hussein Z, Benjamin N, Webb DJ. Physiological role of nitric oxide in regulation of renal function in humans. *Am J Physiol*. 1997;272(3 Pt 2):F364-71
- 61 He XR, Greenberg SG, Briggs JP, Schnermann JB. Effect of nitric oxide on renin secretion. II. Studies in the perfused juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol*. 1995;268(5 Pt 2):F953-9
- 62 Henrich WL, McAllister EA, Smith PB, Campbell WB. Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate as a mediator of inhibition of renin release. *Am J Physiol*. 1988;255(3 Pt 2):F474-8
- 63 Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA, Brenner BM. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Am J Physiol*. 1981;241(1):F85-93
- 64 Ichihara A, Imig JD, Inscho EW, Navar LG. Cyclooxygenase-2 participates in tubular flow-dependent afferent arteriolar tone: interaction with neuronal NOS. *Am J Physiol*. 1998;275(4 Pt 2):F605-12
- 65 Ichihara A, Imig JD, Navar LG. Cyclooxygenase-2 modulates afferent arteriolar responses to increases in pressure. *Hypertension*. 1999;34(4 Pt 2):843-7
- 66 Ichihara A, Inscho EW, Imig JD, Navar LG. Neuronal nitric oxide synthase modulates rat renal microvascular function. *Am J Physiol*. 1998;274(3 Pt 2):F516-24
- 67 Ichihara A, Kobori H, Miyashita Y, Hayashi M, Saruta T. Differential effects of thyroid hormone on renin secretion, content, and mRNA in juxtaglomerular cells. *Am J Physiol*. 1998;274(2 Pt 1):E224-31
- 68 Ichikawa I, Fogo A. Focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol*. 1996;10(3):374-91
- 69 Ignarro LJ. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB J*. 1989;3(1):31-6
- 70 Ignarro LJ. Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signaling. *Pharmacol Toxicol*. 1990;67(1):1-7
- 71 Ingulli E, Tejani A. Racial differences in the incidence and renal outcome of idiopathic focal segmental glomerulosclerosis in children. *Nephrol*. 1991;5(4):393-7
- 72 Ito S, Ren Y. Evidence for the role of nitric oxide in Macula densa control of glomerular hemodynamics. *J Clin Invest*. 1993;92(2):1093-8

- 73 Jensen BL, Kurtz A. Differential regulation of renal cyclooxygenase mRNA by dietary salt intake. *Kidney Int.* 1997;52(5):1242-9
- 74 Jensen BL, Schmid C, Kurtz A. Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol.* 1996;271(3 Pt 2):F659-69
- 75 Johnson RA, Freeman RH. Renin release in rats during blockade of nitric oxide synthesis. *Am J Physiol.* 1994;266(6 Pt 2):R1723-9
- 76 Johnson RJ. The glomerular response to injury: progression or resolution? *Kidney Int.* 1994;45(6):1769-82
- 77 Joseph MH. Brain tryptophan metabolism on the 5-hydroxytryptamine and kynurenine pathways in a strain of rats with a deficiency in platelet 5-HT. *Br J Pharmacol.* 1978;63(3):529-33
- 78 Jung FF, Provoost AP, Bouyounes B, Ingelfinger JR. Persistence of immature renin pattern expression in young fawn-hooded rats. *J Am Soc Nephrol.* 1993;4:773
- 79 Jung FF, Provoost AP, Haveran L, Ingelfinger JR. Upregulation of angiotensin II (AT1) receptors in the hypertensive fawn hooded rat. *J Am Soc Nephrol.* 1995; 6:680
- 80 Kentera D, Susic D, Veljkovic V, Tucakovic G, Koko V. Pulmonary artery pressure in rats with hereditary platelet function defect. *Respiration.* 1988;54(2):110-4
- 81 Ketteler M, Noble NA, Border WA. Transforming growth factor-beta and angiotensin II: the missing link from glomerular hyperfiltration to glomerulosclerosis? *Annu Rev Physiol.* 1995;57:279-95
- 82 Kimmel PL, Ferreira-Centeno A, Farkas-Szallasi T, Abraham AA, Garrett CT. Viral DNA in microdissected renal biopsy tissue from HIV infected patients with nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 1993;43(6):1347-52
- 83 Kirchmaier CM, Meyer M, Spangenberg P, Heller R, Haroske D, Breddin HK, Till U. Platelet membrane defects in fawn hooded bleeder rats. *Thromb Res.* 1990;57(3):353-60
- 84 Knoblich PR, Freeman RH, Villarreal D. Pressure-dependent renin release during chronic blockade of nitric oxide synthase. *Hypertension.* 1996;28(5):738-42
- 85 Korbet SM, Schwartz MM, Lewis EJ. Primary focal segmental glomerulosclerosis: clinical course and response to therapy. *Am J Kidney Dis.* 1994;23(6):773-83
- 86 Korbet SM. Primary focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9(7):1333-40
- 87 Kouwenhoven EA, van Dokkum RP, Marquet RL, Heemann UW, de Bruin RW, IJzermans JN, Provoost AP. Genetic susceptibility of the donor kidney contributes to the development of renal damage after syngeneic transplantation. *Am J Hypertens.* 1999;12(6):603-10
- 88 Kreisberg JI, Karnovsky MJ. Focal glomerular sclerosis in the fawn-hooded rat. *Am J Pathol.* 1978;92(3):637-52
- 89 Kriz W, Elger M, Hosser H, Hahnel B, Provoost A, Kranzlin B, Gretz N. How does podocyte damage result in tubular damage? *Kidney Blood Press Res.* 1999;22(1-2):26-36
- 90 Kriz W, Hosser H, Hahnel B, Gretz N, Provoost AP. From segmental glomerulosclerosis to total nephron degeneration and interstitial fibrosis: a histopathological study in rat models and human glomerulopathies. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13(11):2781-98
- 91 Kriz W, Hosser H, Hahnel B, Simons JL, Provoost AP. Development of vascular pole-associated glomerulosclerosis in the Fawn-hooded rat. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9(3):381-96
- 92 Kriz W, Kretzler M, Nagata M, Provoost AP, Shirato I, Uiker S, Sakai T, Lemley KV. A frequent pathway to glomerulosclerosis: deterioration of tuft architecture-podocyte damage-segmental sclerosis. *Kidney Blood Press Res.* 1996;19(5):245-53
- 93 Kuipers MH, de Jong W. Relationship between blood pressure level, renal histopathological lesions and plasma renin activity in fawn-hooded rats. *Br J Exp Pathol.* 1987;68(2):179-87



- 94 Kuipers MH, de Jong W. Spontaneous hypertension in the fawn-hooded rat: a cardiovascular disease model. *J Hypertens Suppl.* 1986;4(3):S41-4
- 95 Kuipers MH, Gruys E. Spontaneous hypertension and hypertensive renal disease in the fawn-hooded rat. *Br J Exp Pathol.* 1984;65(2):181-90
- 96 Kuipers MH, Provoost AP, de Jong W. Development of hypertension and proteinuria with age in fawn-hooded rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1986;13(3):201-9
- 97 Kuipers MHM, Gruys E. Nephrosclerosis and hypertension in the fawn-hooded rat. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 1981; 94:39
- 98 Kurtz A, Della Bruna R, Pfeilschifter J, Taugner R, Bauer C. Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from juxtaglomerular cells by a cGMP-mediated process. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(13):4769-73
- 99 Kurtz A, Gotz KH, Hamann M, Kieninger M, Wagner C. Stimulation of renin secretion by NO donors is related to the cAMP pathway. *Am J Physiol.* 1998;274(4 Pt 2):F709-17
- 100 Kurtz A, Gotz KH, Hamann M, Wagner C. Stimulation of renin secretion by nitric oxide is mediated by phosphodiesterase 3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(8):4743-7
- 101 Kurtz A, Kaissling B, Busse R, Baier W. Endothelial cells modulate renin secretion from isolated mouse juxtaglomerular cells. *J Clin Invest.* 1991;88(4):1147-54
- 102 Kurtz A, Wagner C. Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *Am J Physiol.* 1998;275(6 Pt 2):F849-62
- 103 Landino LM, Crews BC, Timmons MD, Morrow JD, Marnett LJ. Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(26):15069-74
- 104 Larsson C, Weber P, Anggard E. Arachidonic acid increases and indomethacin decreases plasma renin activity in the rabbit. *Eur J Pharmacol.* 1974;28(2):391-4
- 105 LaVail MM. Fawn-hooded rats, the fawn mutation and interaction of pink-eyed and red-eyed dilution genes. *J Hered.* 1981;72(4):286-7
- 106 Lee AF, Kiely DG, Coutie WJ, Struthers AD. The effect of nitric oxide inhibition on the renin response to frusemide in man. *Br J Clin Pharmacol.* 1999;48(3):355-60
- 107 Mackenzie HS, Provoost AP, Troy JL, Sandstrom S, Rennke HG, Brenner BM. Irbesartan prevents renal injury in uninephrectomized (UNX) Fawn-hooded hypertensive (FHH) rats. *J Am Soc Nephrol.* 1995; 6:1022
- 108 Magro A, Gilboa N, Rudofsky U. The fawn-hooded rat as a genetic hypertensive animal model. In Magro A, Oswald W, Reis D, Vanhoutte P (Ed). *Central and Peripheral Mechanisms of Cardiovascular Regulation.* New York Plenum 1986:219-267
- 109 Magro AM, Rudofsky UH, Gilboa N, Seegal R. Increased catecholamine output in the hypertensive fawn-hooded rat. *Lab Anim Sci.* 1986;36(6):646-9
- 110 Magro AM, Rudofsky UH. Plasma renin activity decrease precedes spontaneous focal glomerular sclerosis in aging rats. *Nephron.* 1982;31(3):245-53
- 111 Mallick NP, Brenchley PE, Webb NJ. Minimal change nephropathy and focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int Suppl.* 1997;58:S80-2

- 112 Manning RD Jr, Hu L, Reckelhoff JF. Role of nitric oxide in the arterial pressure and renal adaptations to long-term changes in sodium intake. *Am J Physiol.* 1997;272(4 Pt 2):R1162-9
- 113 Mathis BJ, Kim SH, Calabrese K, Haas M, Seidman JG, Seidman CE, Pollak MR. A locus for inherited focal segmental glomerulosclerosis maps to chromosome 19q13. *Kidney Int.* 1998;53(2):282-6
- 114 McMillen BA, Williams HL. Volitional consumption of ethanol by fawn-hooded rats: effects of alternative solutions and drug treatments. *Alcohol.* 1995;12(4):345-50
- 115 Metsäranta M, Toman D, De Crombrughe B, Vuorio E. Specific hybridization probes for mouse type I, II, III and IX collagen mRNAs. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1089(2):241-3
- 116 Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43(2):109-42
- 117 Mundel P, Bachmann S, Bader M, Fischer A, Kummer W, Mayer B, Kriz W. Expression of nitric oxide synthase in kidney Macula densa cells. *Kidney Int.* 1992;42(4):1017-9
- 118 Naess PA, Christensen G, Kirkeboen KA, Kiil F. Effect on renin release of inhibiting renal nitric oxide synthesis in anaesthetized dogs. *Acta Physiol Scand.* 1993;148(2):137-42
- 119 Navarro J, Sanchez A, Saiz J, Ruilope LM, Garcia-Estan J, Romero JC, Moncada S, Lahera V. Hormonal, renal, and metabolic alterations during hypertension induced by chronic inhibition of NO in rats. *Am J Physiol.* 1994;267(6 Pt 2):R1516-21
- 120 Nishimura M, Takahashi H, Nanbu A, Ohtsuka K, Yoshimura M. Restriction of dietary sodium may enhance nitric oxide production in rats. *Hypertens Res.* 1997;20(1):57-60
- 121 Noble AR, Abu-Kishk RA, D'Aloia MA, Williams BC, Lush DJ. Cyclic GMP-linked pathway for renin secretion. *Kidney Int.* 1994;46(6):1588-90
- 122 Oliver JD 3rd, Simons JL, Troy JL, Provoost AP, Brenner BM, Deen WM. Proteinuria and impaired glomerular permselectivity in uninephrectomized fawn-hooded rats. *Am J Physiol.* 1994;267(6 Pt 2):F917-25
- 123 Oliver WJ, Neel JV, Grekin RJ, Cohen EL. Hormonal adaptation to the stresses imposed upon sodium balance by pregnancy and lactation in the Yanomama Indians, a culture without salt. *Circulation.* 1981;63(1):110-6
- 124 Overstreet DH, Rezvani AH, Janowsky DS. Genetic animal models of depression and ethanol preference provide support for cholinergic and serotonergic involvement in depression and alcoholism. *Biol Psychiatry.* 1992;31(9):919-36
- 125 Overstreet DH, Rezvani AH. Behavioral differences between two inbred strains of Fawn-Hooded rat: a model of serotonin dysfunction. *Psychopharmacology (Berl).* 1996;128(3):328-30
- 126 Persson PB, Baumann JE, Ehmke H, Hackenthal E, Kirchheim HR, Nafz B. Endothelium-derived NO stimulates pressure-dependent renin release in conscious dogs. *Am J Physiol.* 1993;264(6 Pt 2):F943-7
- 127 Poli A, Abramo F, Taccini E, Guidi G, Barsotti P, Bendinelli M, Malvaldi G. Renal involvement in feline immunodeficiency virus infection: a clinicopathological study. *Nephron.* 1993;64(2):282-8
- 128 Prieur DJ, Meyers KM. Genetics of the fawn-hooded rat strain. The coat color dilution and platelet storage pool deficiency are pleiotropic effects of the recessive red-eyed dilution gene. *J Hered.* 1984;75(5):349-52
- 129 Provoost AP, De Keijzer MH. Kidney function and volume homeostasis during the development of hypertension in the fawn-hooded rat. In Nijkamp FP, De Wied D (Eds). *Hypertension, Brain Catecholamines and Peptides.* Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), Amsterdam, The Netherlands. 1989:45-50

- 130 Provoost AP, Korte M, Van Dokkum RPE. Development of renal damage in the Hypertensive Fawn-hooded rat is not affected by gonadectomy. *Am J Hypertens*. 1998;11:89A
- 131 Provoost AP, Shiozawa M, Van Dokkum RPE, Jakob HJ. Phenotype and genotype variability in four strains of fawn-hooded (FH) rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 1998;25:A33
- 132 Provoost AP. Spontaneous glomerulosclerosis: insights from the fawn-hooded rat. *Kidney Int Suppl*. 1994;45:S2-5
- 133 Rao TKS, Nicastrì AD, Freidman EA. Natural history of heroin-associated nephropathy. *N Engl J Med* 1974; 290:19-23
- 134 Raymond SL, Dodds WJ. Characterization of the fawn-hooded rat as a model for hemostatic studies. *Thromb Diath Haemorrh*. 1975;33(2):361-9
- 135 Reinhardt RR, Chin E, Zhou J, Taira M, Murata T, Manganiello VC, Bondy CA. Distinctive anatomical patterns of gene expression for cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Clin Invest*. 1995;95(4):1528-38
- 136 Remuzzi A, Pergolizzi R, Mauer MS, Bertani T. Three-dimensional morphometric analysis of segmental glomerulosclerosis in the rat. *Kidney Int*. 1990;38(5):851-6
- 137 Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension*. 1992;20(3):298-303
- 138 Rich AR. A hitherto undescribed vulnerability of the juxta-medullary Glomerula in lipid nephrosis. *Bull Johns Hopkins Hosp*. 1957;100: 173-186
- 139 Salvemini D, Seibert K, Masferrer JL, Misko TP, Currie MG, Needleman P. Endogenous nitric oxide enhances prostaglandin production in a model of renal inflammation. *J Clin Invest*. 1994;93(5):1940-7
- 140 Salvemini D, Seibert K, Masferrer JL, Settle SL, Misko TP, Currie MG, Needleman P. Nitric oxide and the cyclooxygenase pathway. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*. 1995;23:491-3
- 141 Sato K, Webb S, Tucker A, Rabinovitch M, O'Brien RF, McMurtry IF, Stelzner TJ. Factors influencing the idiopathic development of pulmonary hypertension in the fawn hooded rat. *Am Rev Respir Dis*. 1992;145(4 Pt 1):793-7
- 142 Savin VJ, Sharma R, Sharma M, McCarthy ET, Swan SK, Ellis E, Lovell H, Warady B, Gunwar S, Chonko AM, Artero M, Vincenti F. Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med*. 1996;334(14):878-83
- 143 Schäfer K, Gretz N, Bader M, Oberbäumer I, Eckardt KU, Kriz W, Bachmann S. Characterization of the Han:SPRD rat model for hereditary polycystic kidney disease. *Kidney Int*. 1994;46:134-152
- 144 Schmidt HH, Lohmann SM, Walter U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1178(2):153-75
- 145 Schnackenberg CG, Tabor BL, Strong MH, Granger JP. Inhibition of intrarenal NO stimulates renin secretion through a Macula densa-mediated mechanism. *J Physiol*. 1997;272(3 Pt 2):R879-86

- 146 Schnermann J, Briggs JP. The function of the juxtaglomerular apparatus: control of glomerular hemodynamics and renin secretion. In Seldin DW, Giebisch G (eds). *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. Raven, New York, USA. 1992;1:1249-1289
- 147 Schnermann J, Schubert G, Hermle M, Herbst R, Stowe NT, Yarimizu S, Weber PC. The effect of inhibition of prostaglandin synthesis on tubuloglomerular feedback in the rat kidney. *Pflugers Arch.* 1979;379(3):269-79
- 148 Schnermann J. Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. *Am J Physiol.* 1998;274(2 Pt 2):R263-79
- 149 Schoen FJ, Cotran RS. Blood Vessels. In Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA. 1999:510-514
- 150 Scholz H, Kurtz A. Involvement of endothelium-derived relaxing factor in the pressure control of renin secretion from isolated perfused kidney. *Clin Invest.* 1993;91(3):1088-94
- 151 Schricker K, Della Bruna R, Hamann M, Kurtz A. Endothelium derived relaxing factor is involved in the pressure control of renin gene expression in the kidney. *Pflugers Arch.* 1994;428(3-4):261-8
- 152 Schricker K, Hamann M, Kurtz A. Nitric oxide and prostaglandins are involved in the Macula densa control of the renin system. *Am J Physiol.* 1995;269(6 Pt 2):F825-30
- 153 Schricker K, Kurtz A. Liberators of NO exert a dual effect on renin secretion from isolated mouse renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol.* 1993;265(2 Pt 2):F180-6
- 154 Schricker K, Potzl B, Hamann M, Kurtz A. Coordinate changes of renin and brain-type nitric-oxide-synthase (b-NOS) mRNA levels in rat kidneys. *Pflugers Arch.* 1996;432(3):394-400
- 155 Shesely EG, Maeda N, Kim HS, Desai KM, Krege JH, Laubach VE, Sherman PA, Sessa WC, Smithies O. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(23):13176-81
- 156 Shiozawa M, Provoost AP, Majewski RR, van Dokkum RPE, Jacob HJ. Interacting genes determine susceptibility to proteinuria after uninephrectomy in rats. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9:394A
- 157 Simons JL, Provoost AP, Anderson S, Rennke HG, Troy JL, Brenner BM. Modulation of glomerular hypertension defines susceptibility to progressive glomerular injury. *Kidney Int.* 1994;46(2):396-404
- 158 Simons JL, Provoost AP, Anderson S, Troy JL, Rennke HG, Sandstrom DJ, Brenner BM. Pathogenesis of glomerular injury in the fawn-hooded rat: early glomerular capillary hypertension predicts glomerular sclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 1993;3(11):1775-82
- 159 Simons JL, Provoost AP, De Keijzer MH, Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Pathogenesis of glomerular injury in the fawn-hooded rat: effect of unilateral nephrectomy. *J Am Soc Nephrol.* 1993;4(6):1362-70
- 160 Singh I, Grams M, Wang WH, Yang T, Killen P, Smart A, Schnermann J, Briggs JP. Coordinate regulation of renal expression of nitric oxide synthase, renin, and angiotensinogen mRNA by dietary salt. *Am J Physiol.* 1996;270(6 Pt 2):F1027-37
- 161 Smith WL, Marnett LJ. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1083(1):1-17

- 162 Sugimoto Y, Namba T, Honda A, Hayashi Y, Negishi M, Ichikawa A, Narumiya S. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP3 subtype. *J Biol Chem*. 1992;267(10):6463-6
- 163 Sweeney TK, Needleman P. Mechanisms underlying the defect in storage pool deficient platelets from fawn-hooded rats. *Fed Proc*. 1979; 38:419
- 164 Takagi M, Takagi M, Franco-Saenz R, Mulrow PJ. Effect of atrial natriuretic peptide on renin release in a superfusion system of kidney slices and dispersed juxtaglomerular cells. *Endocrinology*. 1988;122(4):1437-42
- 165 Tanaka R, Sugihara K, Tatematsu A, Fogo A. Internephron heterogeneity of growth factors and sclerosis--modulation of platelet-derived growth factor by angiotensin II. *Kidney Int*. 1995;47(1):131-9
- 166 Taugner R, Buhle CP, Hackenthal E, Mannek E, Nobiling R. Morphology of the juxtaglomerular apparatus and secretory mechanisms. *Contrib Nephrol*. 1984;43:76-101
- 167 Tetsuka T, Daphna-Iken D, Miller BW, Guan Z, Baier LD, Morrison AR. Nitric oxide amplifies interleukin 1-induced cyclooxygenase-2 expression in rat mesangial cells. *Clin Invest*. 1996;97(9):2051-6
- 168 Tharaux PL, Dussaule JC, Pauti MD, Vassitch Y, Ardaillou R, Chatziantoniou C. Activation of renin synthesis is dependent on intact nitric oxide production. *Kidney Int*. 1997 51(6):1780-7
- 169 Thomson SC, Blantz RC. Homeostatic efficiency of tubuloglomerular feedback in hydropenia, euvoemia, and acute volume expansion. *Am J Physiol*. 1993;264(6 Pt 2):F930-6
- 170 Thorup C, Erik A, Persson G. Macula densa derived nitric oxide in regulation of glomerular capillary pressure. *Kidney Int*. 1996;49(2):430-6
- 171 Thorup C, Persson AE. Inhibition of locally produced nitric oxide resets tubuloglomerular feedback mechanism. *Am J Physiol*. 1994;267(4 Pt 2):F606-11
- 172 Tojo A, Gross SS, Zhang L, Tisher CC, Schmidt HH, Wilcox CS, Madsen KM. Immunocytochemical localization of distinct isoforms of nitric oxide synthase in the juxtaglomerular apparatus of normal rat kidney. *J Am Soc Nephrol*. 1994;4(7):1438-47
- 173 Traynor TR, Smart A, Briggs JP, Schnermann J. Inhibition of Macula densa-stimulated renin secretion by pharmacological blockade of cyclooxygenase-2. *Am J Physiol*. 1999;277(5 Pt 2):F706-10
- 174 Tschopp B, Weiss HJ. Decreased ATP, ADP and serotonin in young platelets of fawn-hooded rats with storage pool disease. *Thromb Diath Haemorrh*. 1974;32(2-3):670-7
- 175 Tschopp TB, Zucker MB. Hereditary defect in platelet function in rats. *Blood* 1972;40:217-226
- 176 Urizar RE, Cerda J, Dodds WJ, Raymond SL, Largent JA, Simon R, Gilboa N. Age-related renal, hematologic, and hemostatic abnormalities in FH/Wjd rats. *Am J Vet Res*. 1984;45(8):1624-31
- 177 Van Dokkum RP, Alonso-Galicia M, Provoost AP, Jacob HJ, Roman RJ. Impaired autoregulation of renal blood flow in the fawn-hooded rat. *Am J Physiol*. 1999;276(1 Pt 2):R189-96
- 178 Van Dokkum RP, Jacob HJ, Provoost AP. Difference in susceptibility of developing renal damage in normotensive fawn-hooded (FHL) and August x Copenhagen Irish (ACI) rats after N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester induced hypertension. *Am J Hypertens*. 1997;10(10 Pt 1):1109-16
- 179 Van Dokkum RP, Jacob HJ, Provoost AP. Genetic differences define severity of renal damage after L-NAME-induced hypertension in rats. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9(3):363-71
- 180 Van Dokkum RP, Sun CW, Provoost AP, Jacob HJ, Roman RJ. Altered renal hemodynamics and impaired myogenic responses in the fawn-hooded rat. *Am J Physiol*. 1999;276(3 Pt 2):R855-63

- 181 Vats AN, Basgen JM, Steffes M, Mauer M. Mean glomerular volume (GV) in minimal change nephrotic syndrome (MCNS), focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), normal children and adults. *J Am Soc Nephrol* 1994;5:797
- 182 Verseput GH, Braam B, Provoost AP, Koomans HA. Tubuloglomerular feedback and prolonged ACE-inhibitor treatment in the hypertensive fawn-hooded rat. *Nephrol Dial Transplant*. 1998;13(4):893-9
- 183 Verseput GH, Koomans HA, Braam B, Weening JJ, Provoost AP. ACE inhibition delays development of terminal renal failure in the presence of severe albuminuria. *Am J Kidney Dis*. 2000;35(2):202-10
- 184 Verseput GH, Provoost AP, Braam BB, Weening JJ, Koomans HA. Angiotensin-converting enzyme inhibition in the prevention and treatment of chronic renal damage in the hypertensive fawn-hooded rat. *J Am Soc Nephrol*. 1997;8(2):249-59
- 185 Verseput GH, Provoost AP, van Tol A, Koomans HA, Joles JA. Hyperlipidemia is secondary to proteinuria and is completely normalized by angiotensin-converting enzyme inhibition in hypertensive fawn-hooded rats. *Nephron*. 1997;77(3):346-52
- 186 Wagner C, Godecke A, Ford M, Schnermann J, Schrader J, Kurtz A. Regulation of renin gene expression in kidneys of eNOS- and nNOS-deficient mice. *Pflugers Arch*. 2000;439(5):567-72
- 187 Wang JL, Cheng HF, Harris RC. Cyclooxygenase-2 inhibition decreases renin content and lowers blood pressure in a model of renovascular hypertension. *Hypertension*. 1999;34(1):96-101
- 188 Weening JJ, Westenend PJ, Nooyen YA, van Brummelen P. Monotherapy with captopril (CAP) prevents progressive sclerosis (GS) in fawn-hooded rats, but ketanserin (K) is ineffective. *Kidney Int*. 1990;37:523
- 189 Welch WJ, Wilcox CS, Thomson SC. Nitric oxide and tubuloglomerular feedback. *Semin Nephrol*. 1999;19(3):251-62
- 190 Welch WJ, Wilcox CS. Role of nitric oxide in tubuloglomerular feedback: effects of dietary salt. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1997;24(8):582-6
- 191 Westenend PJ, Nooyen YA, van der Krogt JA, van Brummelen P, Weening JJ. The effect of a converting enzyme inhibitor upon renal damage in spontaneously hypertensive Fawn Hooded rats. *J Hypertens*. 1992;10(5):417-22
- 192 Wilcox CS, Welch WJ, Murad F, Gross SS, Taylor G, Levi R, Schmidt HH. Nitric oxide synthase in Macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(24):11993-7
- 193 Wilcox CS. Role of Macula densa NOS in tubuloglomerular feedback. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1998;7(4):443-9
- 194 Yamada SS, Sasaki AL, Fujihara CK, Malheiros DM, De Nucci G, Zatz R. Effect of salt intake and inhibitor dose on arterial hypertension and renal injury induced by chronic nitric oxide blockade. *Hypertension*. 1996;27(5):1165-72
- 195 Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, Ruoslahti E, Border WA. Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(5):1814-8

- 196 Yamamoto T, Noble NA, Cohen AH, Nast CC, Hishida A, Gold LI, Border WA. Expression of transforming growth factor-beta isoforms in human glomerular diseases. *Kidney Int.* 1996;49(2):461-9
- 197 Yamamoto T, Watanabe T, Ikegaya N, Fujigaki Y, Matsui K, Masaoka H, Nagase M, Hishida A. Expression of types I, II, and III TGF-beta receptors in human glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9(12):2253-61
- 198 Yang T, Singh I, Pham H, Sun D, Smart A, Schnermann JB, Briggs JP. Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake. *Am J Physiol.* 1998;274(3 Pt 2):F481-9
- 199 Yu H, Sale M, Rich SS, Spray BJ, Roh BH, Bowden DW, Freedman BI. Evaluation of markers on human chromosome 10, including the homologue of the rodent Rf-1 gene, for linkage to ESRD in black patients. *Am J Kidney Dis.* 1999;33(2):294-300
- 200 Zanchi A, Schaad NC, Osterheld MC, Grouzmann E, Nussberger J, Brunner HR, Waeber B. Effects of chronic NO synthase inhibition in rats on renin-angiotensin system and sympathetic nervous system. *Am J Physiol.* 1995;268(6 Pt 2):H2267-73
- 201 Ziai F, Ots M, Provoost AP, Troy JL, Rennke HG, Bogenrenner BM, Mackenzie HS. The angiotensin receptor antagonist, irbesartan, reduces renal injury in experimental chronic renal failure. *Kidney Int Suppl.* 1996;57:S132-6

## **Danksagung**

Danken möchte ich an erster Stelle meinen Eltern Dagmar und Willibald, ohne deren geduldige menschliche und materielle Unterstützung diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Des weiteren gilt mein Dank meinen Mitdoktoranden Roli, Martin, Hendryk und Alex, die mir mit ihrer wohlthuenden Anwesenheit und tatkräftigen Unterstützung manch Tag und manch Nacht im Labor versüßten. Ebenfalls danken möchte ich allen weiteren Mitarbeitern des Labors, insbesondere Kerstin, Jörn, Magdalena, Frau Tapp, Frau Oberbäumer und Herr Resch für die Vermittlung der Methodiken und für Hilfe bei der Durchführung der Experimente und deren Auswertung.

Schließlich gilt mein Dank Prof. Bachmann, der mich sehr persönlich betreut hat und tagtäglich für Rückfragen zur Verfügung stand, für die Überlassung dieses interessanten Projektes und für die Hilfe bei der Bearbeitung desselben.



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Wilko Weichert, an Eides Statt, daß diese Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde, daß die Dissertation auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig an entsprechender Stelle in der Arbeit angegeben sind.

Wilko Weichert

## Lebenslauf

*Name:* Wilko Christian Weichert

*Geburtsdatum:* 22.09.1970

*Geburtsort:* Tübingen

1977-1981	Grundschule Mittlerer Landweg, Hamburg
1981-1990	Gymnasium Borgfelde Lauenburgische Glehrtschule Ratzeburg <b>Abitur</b>
1990-1991	Mitarbeit in einem Entwicklungshilfeprojekt der GTZ in Ecuador
1991-1992	Zivildienst, DRK-Alten- und Pflegeheim Ratzeburg
1992-1995	Studium der Humanmedizin an der Phillips-Universität Marburg <b>Physikum, 1. Staatsexamen</b>
1995-1996	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilian-Universität Würzburg
1996-1999	Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin <i>(1997 Forschungsjahr zur Durchführung des experimentellen Teils dieser Promotion)</i> <b>2. Staatsexamen</b>
1999-2000	Praktisches Jahr in Würzburg, Berlin und Salamanca (Spanien) <b>3. Staatsexamen</b>
Seit 01.01.2001	AiP in der Pathologie der Charité, Humboldt Universität Berlin

## **Anhang A: Publikationsliste**

### *I. Kongressbeiträge*

Weichert W, Provoost AP, Bachmann S. Rolle von NO bei der glomerulären Hyperfiltration im Rattenmodell. Anat Anz. 1998;180S:193-194

Bachmann S, Theilig F, Paliege A, Schülke M, Weichert W, Provoost A. Expression and localization of COX-2 in rodent kidney under normal and experimental conditions. Kidney Blood Press Res. 2000;23:407

### *II. Originalarbeit*

Weichert W, Paliege A, Provoost AP, Bachmann S. Upregulation of juxtaglomerular NOS1 and COX-2 precedes glomerulosclerosis in fawn-hooded hypertensive rats. Am J Physiol Renal Physiol. 2001;280(4):F706-14.